

EVALUATION DU POTENTIEL TOXIQUE D'EXTRAITS ET DE MYCOTOXINE
ELABORES PAR LE CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE *METHARIZIUM*
ANISOPLIAE SUR DES DIPTERES PIQUEURS
(SIMULIIDAE ET CULICIDAE)

MEMOIRE PRESENTE AU
DR. GUY CHARPENTIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
MADAME SUZANNE LEPAGE

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES
FEVRIER 1992

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

TABLE DES MATIERES

	Page
TABLE DES MATIERES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
SOMMAIRE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvi
PROBLEMATIQUE.....	1
INTRODUCTION.....	5
1. MATERIEL ET METHODES.....	11
1.1. Préparation des solutions pour les traitements en laboratoire.....	11
1.1.1. Les extraits bruts de <i>M. anisopliae</i>	11
1.1.2. L'extrait brut de <i>M. anisopliae</i> incorporé à une pâte d'amidon.....	13
1.1.3. La destruxine E de <i>M. anisopliae</i>	14
1.2. Application des produits en laboratoire, sur des larves de simulies.....	14
1.2.1. Localisation des sites et méthodes de prélè- vement des larves de simulies.....	14
1.2.2. Système de maintenance des larves de simulies.....	15

	Page
1.2.3. Bioessais sur simulies avec le système de traitement en béciers.....	17
1.2.4. Bioessais sur simulies avec le système de traitement en tubes.....	20
1.3. Application des extraits bruts sur le terrain, sur des larves de simulies.....	22
1.3.1. Systeme de traitement et colonisation des dalles.....	22
1.3.2. Determination des concentrations à appliquer.....	24
1.3.2.1. Traitement avec le Teknar HP-D®.....	24
1.3.2.2. Comparaison entre les résultats obtenus sur le terrain et en laboratoire avec le Teknar HP-D®.....	25
1.3.3. Préparation des solutions d'extraits bruts....	30
1.3.4. Préparation de l'extrait brut (JD 264) avec les solutions de Na ₂ HPO ₄ et de CaCl ₂	30
1.3.5. Préparation du mélange Teknar HP-D® avec l'extrait brut.....	31
1.4. Application des produits en laboratoire, sur des larves de moustiques.....	31
1.4.1. Elevage du moustique <i>Aedes triseriatus</i>	31
1.4.2. Protocole des bioessais sur <i>A. triseriatus</i>	32
1.4.2.1. Larves de 1 ^{er} et de 3 ^{ième} stades....	32
1.4.2.2. Larves néonates.....	34

	Page
1.4.2.2.1. Effet sur la croissance des larves néonates.....	35
1.4.2.2.2. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec des larves néonates.....	36
1.4.3. Mesure de la longueur des larves néonates ou de 3 ^{ième} stade.....	37
1.5. Nettoyage de la vaisselle.....	38
1.6. Traitements statistiques des données.....	39
2. RESULTATS.....	41
2.1. Larves de simuliés.....	41
2.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts de <i>M. aniso-</i> <i>pliae</i>	41
2.1.1.1. Résultats obtenus en laboratoire....	42
2.1.1.2. Résultats obtenus sur le terrain avec les extraits bruts de <i>M. ani-</i> <i>sopliae</i>	47
2.1.1.3. Traitement avec le Teknar HP-D [®] et l'extrait JD261 sur le terrain.....	49
2.2. Larves de moustiques (<i>A. triseriatus</i>).....	50
2.2.1. Résultats obtenus avec les extraits bruts de <i>M. anisopliae</i>	50
2.2.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90 sur des larves néonates.....	51

	Page
2.2.1.2. Détermination des concentrations létales 50 et 90 sur des 3 ième stade.....	53
2.2.1.3. Effets sur la croissance.....	59
2.2.1.4. Pourcentage d'émergence.....	62
2.2.2. Résultats obtenus avec la destruxine E de <i>M. anisopliae</i>	64
2.2.2.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90.....	64
2.2.2.2. Effets sur la croissance.....	68
2.2.2.3. Pourcentage d'émergence.....	70
2.2.2.4. Persistance.....	72
3. DISCUSSION.....	76
3.1. Larves de similies.....	76
3.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts de <i>M. aniso-</i> <i>pliae</i>	76
3.1.1.1. Résultats obtenus en laboratoire....	76
3.1.1.2. Résultats obtenus sur le terrain avec les extraits bruts.....	80
3.1.1.3. Traitement avec le Teknar HP-D [®] et l'extrait JD261 sur le terrain.....	84
3.2. Larves de moustiques.....	86
3.2.1. Résultats obtenus avec les extraits bruts (JD261, JD263 et JD264) sur des larves néonates.....	86

	Page
3.2.2. Résultats obtenus avec les extraits bruts (JD263 et JD 264) sur des larves de 3 ième stade.....	87
3.2.3. Résultats obtenus avec la destruxine E de <i>M. anisopliae</i>	90
CONCLUSION.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	101
ANNEXE I.....	111
ANNEXE II.....	113
ANNEXE III.....	115
ANNEXE IV.....	118

LISTE DES FIGURES

	Page
1 Structures des destruxines (A, B et E) produites par <i>M. anisopliae</i>	7
2 Système de maintenance pour les larves de simuliés.....	16
3 Système de traitement en béciers pour les larves de simuliés.....	19
4 Système de traitement en tubes pour les larves de simuliés.....	21
5 Système de traitement en dalles pour les larves de simuliés.....	23
6 Mesure de la longueur (LC = Longueur du corps) des larves d' <i>A. triseriatus</i>	38
7 Droites calculées à partir des valeurs obtenues après des temps de contact et de lecture différents.....	45
8 Valeurs obtenues en laboratoire et droite obtenue après analyse des données.....	46
9 Droites obtenues après l'analyse des données recueil- lies lors des lectures des mortalités de 24, 48 et 72 heures.....	47

	Page
10 Valeurs obtenues avec des larves néonates exposées aux extraits bruts, (a) JD261, (b) JD263, (c) JD264. La droite et l'équation probit ainsi que la CL50 sont indiquées pour chaque extrait. Afin de faciliter l'interprétation, les droites ont également été regroupées (d).....	52
11 Résultats obtenus après 11 jours, avec l'extrait JD263 et avec l'extrait JD263 enrobé dans de l'amidon.....	54
12 Valeurs obtenues avec l'extrait JD263 pour les expériences #14 et #15 après 11 jours de contact.....	55
13 Compilation des droites probit obtenues avec le lot JD263 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #14.....	56
14 Compilation des droites probit obtenues avec le lot JD263 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #15.....	56
15 Valeurs obtenues avec l'extrait JD264 pour l'expérience #16 après 11 jours de contact.....	57
16 Compilation des droites probit obtenues avec l'extrait JD264 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #16.....	58
17 Effets de l'extrait brut (Lot: JD 263) sur des larves de 3 ième stade d' <i>A. triseriatus</i> , après 4 jours de contact continu avec le produit, en comparaison à des larves témoins.....	61

	Page
18 Pourcentage d'émergence et de nymphes mortes chez le témoin et les individus exposés à l'extrait JD263, ainsi que les temps d'émergence, pour l'expérience #15.....	63
19 Pourcentage d'émergence chez le témoin et les individus exposés à l'extrait JD264, ainsi que les temps d'émergence, pour l'expérience #17.....	63
20 Résultats de l'expérience #20 après 7 jours et 14 jours de contact avec la destruxine E.....	66
21 Compilation des droites probit obtenues avec la destruxine E sur des larves de 1 ^{er} stade après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #20.....	67
22 Pourcentage d'émergence chez les témoins et les individus exposés à la destruxine E, ainsi que les temps d'émergence.....	71

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1 Résultats retenus pour la détermination des concentrations d'extraits bruts à appliquer sur le terrain.....	26
2 Conditions expérimentales lors du traitement avec la destruxine E, sur des larves néonates.....	36
3 Éléments spécifiques aux différentes expériences en laboratoire.....	43
4 Résultats obtenus après 1 heure de contact et 24 heures d'observation pour l'expérience #12.....	49
5 Longueurs moyennes des larves témoins et des larves soumises au traitement (3 ième stade), ainsi que les mortalités obtenues.....	61
6 Résultats des tests préliminaires avec la destruxine E (DE) sur des larves de 3 ième stade.....	65
7 Résultats obtenus chez les témoins et les larves exposées à la destruxine E après 96 heures, pour la plaquette A.....	68
8 Résultats obtenus après 6 jours chez les témoins et les individus soumis au traitement, à une température de 21°C.....	73

Tableaux de l'ANNEXE IV

A) Résultats des expériences avec des larves de simules

	Page
9 Résultats obtenus après 24 heures d'observation (Exp.#1).....	116
10 Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'obser- vation (Exp.#2).....	117
11 Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'obser- vation (Exp.#3).....	118
12 Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'obser- vation (Exp.#4).....	119
13 Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'obser- vation (Exp.#5).....	120
14 Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'obser- vation (Exp.#6).....	121
15 Résultats obtenus après 24, 48, 72 et 96 heures d'observation (Exp.#7).....	122
16 Résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'ob- servation (Exp.#8).....	123

B) Résultats des expériences avec des larves de moustiques

17 Résultats obtenus après 24 heures sur des larves neonates exposees aux extraits (Exp.#13).....	126
18 Résultats obtenus après 6 et 11 jours d'obser- vation (Exp.#14).....	127

	Page
19 Résultats obtenus après 7, 11 et 13 jours d'ob- servation (Exp.#15).....	128
20 Résultats obtenus après 3, 7, 11 et 13 jours d'observation avec le lot JD264 (Exp.#16).....	129
21 Résultats obtenus après 3, 7 et 14 jours d'ob- servation (Exp.#20).....	131

LISTE DES ABREVIATIONS

a: adulte (s)

CL 50 : concentration létale 50%

CL 90 : concentration létale 90%

Eau d.n.d.: eau distillée non-déminéralisée

g: gramme (s)

h: heure (s)

j: jour (s)

l: larve (s)

L: litre (s)

L s⁻¹: litre par seconde (débit)

L.I. : limite inférieure

L.S. : limite supérieure

m: morte (s)

mg: milligramme (s)

mL: millilitre

n: nymphe (s)

N: nombres de points expérimentaux

P: probabilité

ppm : partie par million (mg/L)

sem: semaine (s)

SOMMAIRE

Les différents problèmes occasionnés par les Simuliidae, communément appelés mouches noires, et les Culicidae (moustiques) vont de l'irritation cutanée jusqu'à la transmission d'agents pathogènes pouvant provoquer des maladies chez l'homme ou chez les animaux.

Les méthodes de contrôle se font à partir des stades immatures qui vivent en milieu aquatique. Des insecticides chimiques sont déversés dans leur environnement. Cependant, le développement de résistance, ainsi que la non sélectivité des produits affectent la qualité de l'environnement.

Bien que l'utilisation actuelle d'un insecticide biologique (Teknar[®] ou Vectobac[®]) améliore de beaucoup cette situation, il n'en demeure pas moins que les risques de développement de résistance sont toujours présents.

Afin de pallier à cette éventualité, plusieurs recherches se sont orientées vers l'utilisation de mycotoxines comme insecticides. Mon mémoire porte sur l'évaluation du potentiel larvicide de diverses substances (extraits bruts et mycotoxine purifiée) élaborées par le champignon entomopathogène *Metarhizium*

anisopliae. Les bioessais sont réalisés chez des spécimens appartenant aux Simuliidae et aux Culicidae.

REMERCIEMENTS

Ce projet de recherches a pu être réalisé avec l'aide de plusieurs personnes. En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement le Dr. Guy Charpentier, directeur de ce projet, pour son intérêt soutenu et ses critiques pertinentes tout au cours de cette étude, ainsi que pour son aide financière.

Mes remerciements vont aussi au Dr. Jacques Boisvert pour ses idées et ses précieux conseils. Il a également dirigé des travaux de recherches destinés à compléter certaines parties de cette étude.

Je remercie également le Dr. Antoine Aubin pour sa disponibilité et pour son aide indispensable lors de l'analyse statistique des données ainsi qu'à M. Alain Chalifour, de même que le Dr. Alain Maire pour ses conseils dans l'élaboration du projet.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers madame Liette Laganière pour son support technique et sa participation à ce projet de recherches, de même qu'à madame Dominique Pecqueur pour son aide lors de l'exécution de bioessais en laboratoire.

De plus, je remercie le Dr. Jean-Marie Quiot et le Dr. Alain Vey, chercheurs à la Station de recherches de pathologie comparée en France, pour leur précieuse collaboration et pour tout leur effort dans la réalisation et la réussite de ce projet.

Enfin, je tiens à remercier le Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche pour l'aide financière qu'il m'ont fourni lors de cette étude.

PROBLEMATIQUE

Les diptères piqueurs appartenant aux familles des Simuliidae et des Culicidae sont réputés pour leur nuisance durant une bonne période de l'année. Que l'on pense aux travailleurs, aux vacanciers ou même aux animaux domestiques, leur présence est des plus désagréable.

Chez les simulies, communément appelées mouches noires, et les moustiques, les femelles de la plupart des espèces sont hématophages. Le repas de sang nécessaire à la maturation des oeufs peut occasionner chez l'hôte une vive irritation cutanée, pouvant même aller jusqu'à de graves réactions allergiques chez certaines personnes. Ce mode d'alimentation peut également être responsable de la transmission d'agents pathogènes qui peuvent provoquer des maladies chez l'homme ou chez les animaux (Maire et Aubin, 1980; Belloncik *et al.*, 1982; Belloncik *et al.*, 1983; Wood, 1985).

Les stades immatures de ces insectes se développent dans des habitats aquatiques. Les femelles de moustiques recherchent les étendues d'eau stagnante alors que les femelles de simulies déposent leurs oeufs dans les cours d'eau et les rivières bien oxygénées.

Suite à l'éclosion des oeufs, les larves s'alimentent des particules présentes dans le milieu aquatique. Etant localisées, elles deviennent une cible idéale pour entreprendre une réduction des populations. Des insecticides de contact ou particuliers sont alors déversés dans leur environnement.

Les insecticides chimiques employés dans la lutte contre les insectes présentent souvent des inconvénients importants envers le milieu naturel et les espèces compagnes. Ils sont en général peu sélectifs et peuvent persister longtemps dans l'environnement. Ils sont alors susceptibles de s'accumuler sous diverses formes dans les chaînes trophiques et de provoquer des dommages considérables aux organismes vivants (Laird *et al.*, 1983).

Le développement d'une résistance des insectes nuisibles vis-à-vis ces produits est un autre point négatif. Ceci engendre une augmentation des concentrations à appliquer pour que le traitement s'avère efficace (Brown et Pal, 1973; Flint et Van den Bosch, 1983).

Une autre méthode de contrôle est l'utilisation d'insecticides biologiques. Un grand nombre d'entre eux sont encore testés à titre expérimentale. Ceux-ci sont élaborés à partir d'organismes vivants, souvent pathogènes envers l'insecte visé. Mis en présence de son hôte, l'organisme provoquera la mort de l'insecte. Il peut également s'agir des métabolites fabriqués par

un pathogène, et qui sont introduits dans le milieu fréquenté par l'espèce cible.

Contrairement aux insecticides chimiques, ils possèdent généralement une haute spécificité et ne persistent que peu de temps dans l'environnement. Cependant, le développement d'une résistance a pu être observé en laboratoire et sur le terrain avec certaines variétés de *Bacillus thuringiensis* actives contre les lépidoptères (McGaughey et Beeman, 1988; Tabashnik *et al.*, 1990; Tabashnik *et al.*, 1991).

Actuellement, il existe au Québec, un contrôle des populations de simulies et de moustiques à l'aide d'insecticides microbiologiques, connus sous le nom de Vectobac® et Teknar®. Ces deux formulations sont fabriquées par deux compagnies différentes (Abbott Laboratories et Zoëcon Corporation). Le principe actif du larvicide est un cristal protéinique élaboré par la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Ce cristal, une fois ingéré par la larve, exerce son effet toxique et cause des dommages cellulaires entraînant la larve vers une mort certaine.

Bien que le développement d'une résistance chez les simulies ou les moustiques n'ait pas encore été décelé avec ce composé, il est important de poursuivre les études en vue d'élaborer de nouveaux insecticides biologiques afin d'être prêt à répondre à toutes éventualités.

Les champignons entomopathogènes sont des plus prometteurs. Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975). L'un des plus intéressants appartient à la classe des Deutéromycètes. C'est l'hyphomycète (Moniliale) *Metarhizium anisopliae*, connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (Veen, 1968; Samuels *et al.*, 1989).

Lors de l'invasion de l'insecte par les hyphes du champignon, des métabolites toxiques sont émis par le pathogène. Ces métabolites accélèrent la mort de hôte (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989).

Le potentiel toxique de ces toxines doit être étudié au niveau des diptères piqueurs, afin d'évaluer les possibilités d'utiliser de telles substances comme insecticide, pour le contrôle des populations de simuliés ou de moustiques.

INTRODUCTION

L'utilisation des toxines de champignons entomopathogènes doit être envisagée dans l'élaboration de nouveaux insecticides biologiques (Roberts, 1981; Wright *et al.*, 1982; Ignoffo, 1988). Les champignons entomopathogènes sont connus depuis plus de 100 ans comme de bons régulateurs de populations d'insectes (Papierok et Brey, 1989).

L'un des plus intéressant est l'hyphomycète (Monoliale) *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin appartenant à la classe des Deutéromycètes (Champignons imparfaits). Sa pathogénécité a été observée sur au moins 200 espèces d'insectes classées dans 8 ordres différents (Orthoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Hyménoptères, Homoptères, Diptères et Dermaptères) (Veen, 1968; Samuels *et al.*, 1989).

Chez certains champignons entomopathogènes incluant *Metarhizium anisopliae*, il y a production de mycotoxines pendant la pénétration des hyphes dans l'insectes. Ces métabolites secondaires jouent un rôle important lors de l'invasion de l'insecte par le pathogène, puisqu'ils accélèrent la mort de l'hôte et permettent au

champignon de proliférer plus rapidement (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989).

Des protéases, des cytochalasines ainsi que la prodestruxine sont tous des métabolites élaborés par *M. anisopliae*. Cependant, les plus intéressants restent les hexacyclodepsipeptides du groupe des destruxines isolés de ce champignon. Actuellement, 14 depsipeptides différents ont été identifiés (Pais *et al.*, 1981; Ignoffo, 1988). Elles sont caractérisées par un cycle commun de 5 acides aminés: β -alanine, alanine, valine, isoleucine, proline. Elles ont toutes un faible poids moléculaire. Trois d'entre elles sont produites en plus grande quantité que les autres. Il s'agit de la destruxine A, de la destruxine B et de la destruxine E. La différenciation de ces trois structures se situe au niveau de l'acide α -hydroxylé, qui présente: soit une double liaison entre les carbones γ, δ (DA), soit un groupement méthyle en γ (DB), soit un cycle époxyde en γ, δ (DE) (fig. 1) (Pais *et al.*, 1981).

Fargues et Roberts (1986) mentionnent les résultats de différentes études portant sur la toxicité des destruxines (A, B et E) vis-à-vis des invertébrés. Les destruxines étaient mises en contact avec les insectes par incorporation dans le substrat d'élevage, par ingestion forcée ou par exposition à du feuillage traité. Plus de 10 espèces d'insectes (Diptères, Lépidoptères, Coléoptères) ont présenté à des degrés différents une toxicité en présence de ces substances. D'autres études effectuées sur des diptères et incluant cet article, ainsi que des tests réalisés dans

Etant donné que le coût de production pour obtenir un produit pur comme la destruxine E est très élevé, il devient plus intéressant d'évaluer les possibilités d'utiliser un produit moins raffiné. Mon objectif est donc d'évaluer s'il existe des effets toxiques quelconques suite à l'utilisation d'extraits bruts, obtenus à partir de fermentations de *M. anisopliae* (souche *M.a.* 120). Bien que ces extraits soient issus de la même souche, il faut considérer qu'elles sont préparées à des dates différentes et que le procédé d'extraction comporte quelques modifications. Bien entendu, ces extraits contiennent tous les 14 destruxines et également d'autres substances d'origine organique (lipides, protéases, débris cellulaires) ou chimique (à l'état de trace: chlorure de méthylène). Il s'agit avant tout, dans cette étude, d'accumuler des données de base qui pourront indiquer les possibilités de poursuivre les recherches sur mouches noires et/ou moustiques. Puisqu'aucune étude n'a encore été réalisée avec de tels produits sur ces diptères, et que les quantités d'extraits sont très limitées, il devient important de recueillir le plus d'informations possible lors de chaque bioessai. Ainsi, l'observation des effets toxiques porte sur l'évaluation des concentrations létales, mais également sur tout autres aspects négatifs vis-à-vis les larves tels que, l'effet sur la croissance ou la persistance des produits une fois introduit dans leur milieu. De plus, la destruxine E est utilisée dans certains bioessais puisqu'elle est la plus efficace sur les diptères. Cela permet de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les extraits bruts et

ainsi connaître l'importance que la destruxine E occupe dans l'activité toxique des extraits.

Les principaux problèmes occasionnés par les diptères piqueurs sont causés par deux grandes familles. Il s'agit de la famille des Simuliidae et de la famille des Culicidae. Une façon efficace de réduire les populations de diptères piqueurs est l'utilisation de larvicides déversés dans le milieu aquatique, ce qui provoque la mort des stades immatures.

Les tests sont réalisés avec des spécimens appartenant à ces deux familles. Les Culicidae sont représentés par les larves de moustiques *Aedes triseriatus* (Say), provenant de l'élevage du Groupes de Recherche sur les Insectes Piqueurs de l'Université du Québec à Trois-Rivières. La famille des Simuliidae, quant à elle, est représentée par au moins 6 espèces puisqu'elles sont récoltées dans différents émissaires durant les 4 saisons.

La raison pour laquelle les bioessais sont effectués sur ces deux familles est en rapport avec le mode d'alimentation ainsi que l'environnement aquatique où vivent les larves. Ces deux facteurs peuvent avoir une influence quelconque sur le pouvoir toxique des substances utilisées. Les larves d'*Aedes triseriatus* vivent en eaux stagnantes et s'alimentent en broutant les particules solides. Cependant, elles sont également aptes à filtrer les particules en suspension dans le milieu (Wallace et Merritt, 1980; Merritt et Craig, 1987). Les larves de Simuliidae sont classées comme

organismes filtreurs bien que capables de brouter la matière organique présente sur les substrats, à l'aide de leurs mandibules. Elles vivent en eaux courantes telles que les rivières et les ruisseaux (Puri, 1925; Wallace et Merritt, 1980).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation des solutions pour les traitements en laboratoire

Les extraits bruts et la destruxine E (DE) de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, proviennent de la Station de recherche de Pathologie Comparée de Saint-Christol-les-Alès (France). Le champignon hyphomycète *M. anisopliae*, plus précisément la souche *M.a.* 120, produite in vitro en milieu liquide, a été confié à la Station par le Dr. D.W. Roberts du Boyce Thompson Institute (New York) en 1978. Les fermentations du champignon et les préparations d'extraits bruts ont été réalisées à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique à Gif-sur-Yvette (France) par M. A. Escaut. La purification de la destruxine E a été effectuée par Mme M. País du même Institut (País *et al.*, 1981).

1.1.1. Les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*

Trois lots différents d'extraits bruts sont utilisés dans les expériences. Il s'agit des lots JD 261 (4 g), JD 263 (7,5 g)

daté du 07/1987 et le plus récent, JD 264 (22,4 g) préparé le 07/03/1990.

Pour chaque expérience, une solution mère est préparée. L'extrait brut est d'abord solubilisé dans de l'acétone. La quantité adéquate d'acétone est déterminée d'après la proportion suivante: 5,3 mg d'extrait brut pour 0,1 mL d'acétone.

Une fois l'extrait dissous dans l'acétone, il suffit de rajouter la quantité d'eau d.n.d. nécessaire pour obtenir la concentration désirée de la solution mère. Il est important de mentionner que lors de l'ajout de l'eau dans le lot JD 263 ou JD 264, la solution obtenue reste d'apparence liquide. Cependant, lorsque cette solution est regardée sous microscope, de nombreuses petites particules y sont présentes. Avec le lot JD 261, la solution a une apparence différente. Il y a formation d'un précipité floconneux visible à l'oeil nu, dès que l'eau entre en contact avec cet extrait et l'acétone.

Pour avoir la concentration désirée, il s'agit d'incorporer une certaine quantité de solution mère à l'eau du bioessai dont le volume est déjà connu.

1.1.2. L'extrait brut de *Metarhizium anisopliae* incorporé à une pâte d'amidon

Bien que le potentiel toxique de l'extrait brut est évident, il semble intéressant d'effectuer quelques tests préliminaires avec un enrobage d'extrait brut dans de l'amidon. Ceci, pour évaluer si la présentation de l'extrait serait plus efficace sous cette forme étant donné le mode de nutrition des larves de moustiques (Wallace et Merritt, 1980; Merritt, 1987).

Cet enrobement, relativement simple à préparer, consiste à mélanger à une pâte d'amidon, une quantité d'extrait brut (Lot JD 263) préalablement dissous dans de l'acétone. Elle est ensuite étendue et séchée, puis broyée en une fine poudre composée de particules variant de 5 à 60 μm (voir Annexe I) (Dunkle et Shasha, 1988; Gagnon, 1989 ; Kabore, 1990).

Lors d'un bioessai, une solution mère est préparée avec la poudre d'amidon et d'extrait comme avec l'extrait brut seul. Cependant, il n'y a pas d'acétone ajouté mais seulement un certain volume d'eau d.n.d.. Pour s'assurer qu'il n'y a pas d'agglomération de particules, la solution est agitée dans un agitateur Blendor (Canlab) pendant 10 à 15 minutes. Cette solution contient donc la poudre qui n'est pas dissoute et doit être agitée à chaque fois qu'un volume donné est prélevé pour le bioessai.

1.1.3. La destruxine E de *Metarhizium anisopliae*

Tout comme pour l'extrait brut, une solution mère est préparée en respectant la proportion suivante: 5 mg de DE pour 0,1 mL d'acétone. Puis le volume d'eau d.n.d. requis est rajouté pour compléter la solution mère.

1.2. Application des produits en laboratoire, sur des larves de simulies

Les bioessais sont réalisés avec des larves de simulies recueillies sur le terrain et maintenues en laboratoire à l'aide d'un système de maintenance jusqu'à ce qu'elles soient utilisées.

1.2.1. Localisation des sites et méthodes de prélèvement des larves de simulies

Les récoltes des larves sont faites dans différents cours d'eau de la région de Saint-Mathieu (Lac des Souris et Lac Garand), de la région de Saint-Alexis (Lac Bélanger) et de la réserve faunique du Saint-Maurice (Lac Inman Est) (voir Annexe II).

Les larves de divers stades sont prélevées dans les émissaires des lacs sur des roches, des herbes ou tous autres substrats présents dans le milieu. Le substrat colonisé par les larves est déposé et dépouillé de ses occupantes directement dans le système de maintenance (fig. 2). Ceci évite le regroupement des

larves en amas, qui est causée par la production de soie. Si cette méthode ne peut pas être appliquée, la récolte s'effectue à l'aide d'un filet "troubleau".

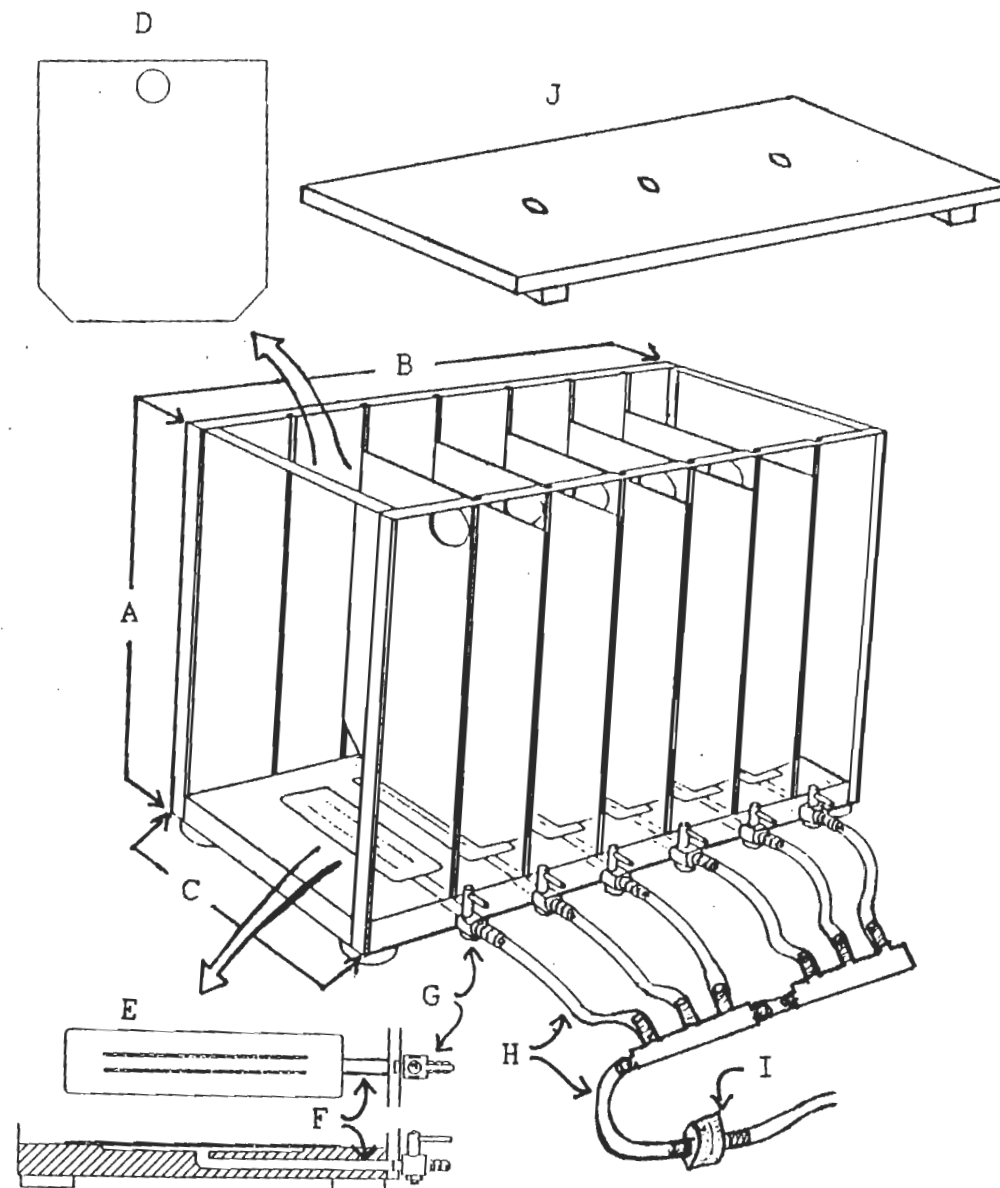
Ce bac de maintenance, qui contient l'eau du ruisseau, est placé dans une glacière. Pour conserver la température de l'eau, de la glace est placée dans celle-ci lorsque cela s'avère nécessaire. L'alimentation en air dans le bac est assurée par des pompes d'aquarium à batteries.

En laboratoire, le bac est placé dans une étuve (Conviron). La température à l'intérieur de celle-ci est maintenue à environ 4°C pour les larves "d'hiver" et à 6°C pour les larves "d'été". La photopériode est de 18:6.

1.2.2. Système de maintenance des larves de simulies

Les larves sont maintenues en conditions optimums dans un "bac de maintenance" mis au point par notre groupe de recherche (fig. 2) (Lacoursière *et al.*, 1987).

D'une capacité maximum de 6,5 litres, celui-ci est rempli avec 6 litres d'eau. Cette eau est remplacée après 4 ou 5 jours par d'autre eau de ruisseau, afin d'éliminer les déchets métaboliques qui sont produits par les larves et également, pour fournir un nouvel apport en nourriture à celles-ci.



Légende:

A: Hauteur 17 cm

B: Longueur 26,5 cm

C: Largeur 15 cm

D: Plaque amovible
en Plexiglas

E: Plaquette à
double
perforations

F: Conduit à air

G: Valve métallique,
pour le contrôle
de l'air

H: Tube de plastique
flexible

I: Filtre à air

J: Couvercle à trois
trous, en
Plexiglas

Fig. 2: Système de maintenance pour les larves de simules.

Les traitements en laboratoire sont réalisés à différentes températures, qui se situent entre 9° et 16° C. Elles correspondent aux températures retrouvées dans les ruisseaux au printemps, alors que des contrôles de populations sont nécessaires. Le choix de la température est également sélectionné d'après la catégorie (hivernale ou estivale) dans laquelle les espèces utilisées se retrouvent lors du traitement. Les seuils de températures viables pour les espèces classées dans la première catégorie ne sont pas les mêmes que celles de la seconde catégorie (Back et Harper, 1979; Colbo et Porter, 1980). Une température trop basse ou trop élevée peut affecter le comportement des larves ou provoquer de forte mortalité.

Lors du décompte des mortalités dans un traitement, que ce soit pour les larves de simuliés ou de moustiques, les larves moribondes sont considérées comme vivantes. Afin de vérifier son état, une légère pression est exercée sur la larve avec une tige de verre à bout arrondi.

1.2.3. Bioessais sur simuliés avec le système de traitement en béciers

Différentes espèces de larves de simuliés sont utilisées lors des bioessais, puisque les espèces présentent dans les cours d'eau varient selon les saisons. Celles-ci sont réparties en deux catégories, soit les espèces univoltines à développement hivernal (*Frosimulium mixtum* / *fuscum* ; *Cnephia mutata*), soit les espèces

polyvoltines à développement vernal ou estival (*Simulium decorum* ; *Simulium venustum* / *verecundum* ; *Simulium tuberosum* ; *Simulium corbis*) (Back et Harper, 1979).

Lors des bioessais, des larves des derniers stades larvaires sont choisies, c'est-à-dire 5 ième et 6 ième stades. Les larves sont déposées à l'aide d'un compte-gouttes dans des béciers de 600 mL. Afin de réduire les quantités de produits à utiliser, le volume d'eau dans chaque bécier est de 250 mL pour une densité variant de 30 à 50 larves, selon le nombre de spécimens disponibles au moment du bioessai. Par la suite, chaque concentration est déversée dans 2 ou 3 béciers.

Chaque bécier est pourvu d'un diffuseur d'air puis déposé dans le bac à température contrôlée (fig. 3). Ce bac est rempli d'eau et entouré d'un isolant (Styrofoam). Un appareil de refroidissement à circuit fermé permet la régulation de la température.

Après un temps d'adaptation, la solution mère est ajoutée dans chaque bécier. Des témoins et des témoins acétones sont présents dans chaque traitement. Les témoins acétones reçoivent une concentration en acétone équivalente à celle ajoutée pour la plus forte concentration de toxines testées. Puis, l'eau est remplacée après un certain temps de contact avec les larves. Il s'agit de verser sur un tamis pour retenir les larves qui décrochent puis, d'ajouter de l'eau propre de même température que la précédente.

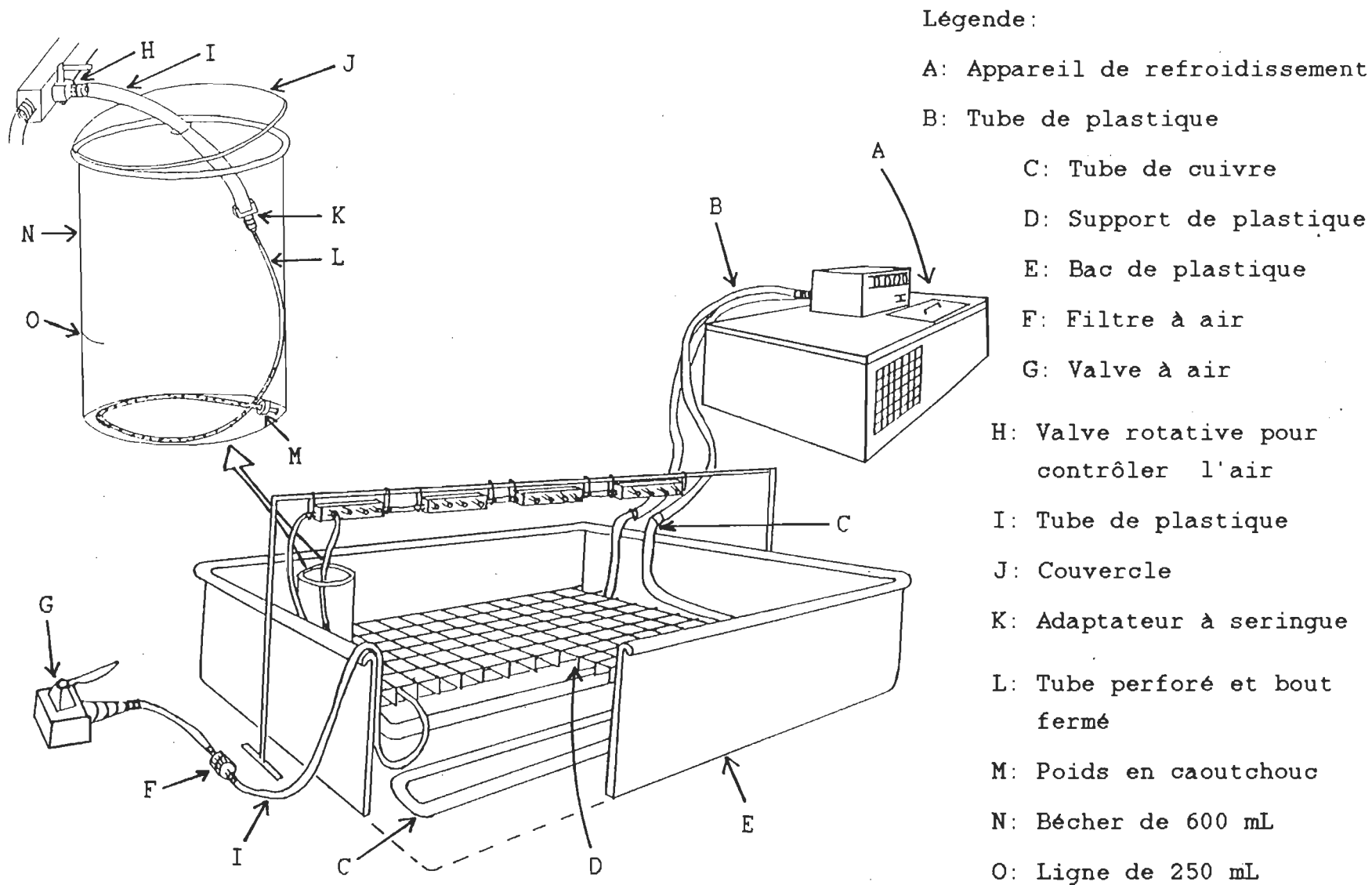


Fig.3: Système de traitement en béchers pour les larves de simulies.

Les larves recueillies par le tamis sont remises précautionneusement dans le b cher.

1.2.4. Bioessais sur simules avec le système de traitement en tubes

Afin de remédier au problème des produits qui sont en quantités limitées, un nouveau système est construit (fig. 4). Un volume moins important d'eau (40 mL) est mis dans chaque tube comparativement au système en b chers (250 mL). Ce système miniaturisé permet donc d'utiliser moins de produits.

Pour respecter la même densité, il faut mettre de 5 à 8 larves par tube, soit 24 larves si l'on utilise 3 tubes par concentration. Ce petit échantillon s'avère plus ou moins valable lors des analyses statistiques. Des prétests sont donc réalisés avec une formulation de Teknar^R HP-D (Zoëcon Corporation, Lot 0080227), afin de vérifier s'il y a des différences de mortalité entre les deux systèmes, tout en ayant diverses densités de larves dans chacun d'eux. Ces prétests démontrent peu de différence dans les mortalités. La densité retenue pour nos bioessais est de 40 larves pour 40 mL d'eau dans chaque tube. Les manipulations sont les mêmes que pour le système en b chers. Chaque concentration est également déversée dans 2 ou 3 tubes.

Le système est placé dans une chambre environnementale pour le contrôle de la température et de la photopériode (18:6).

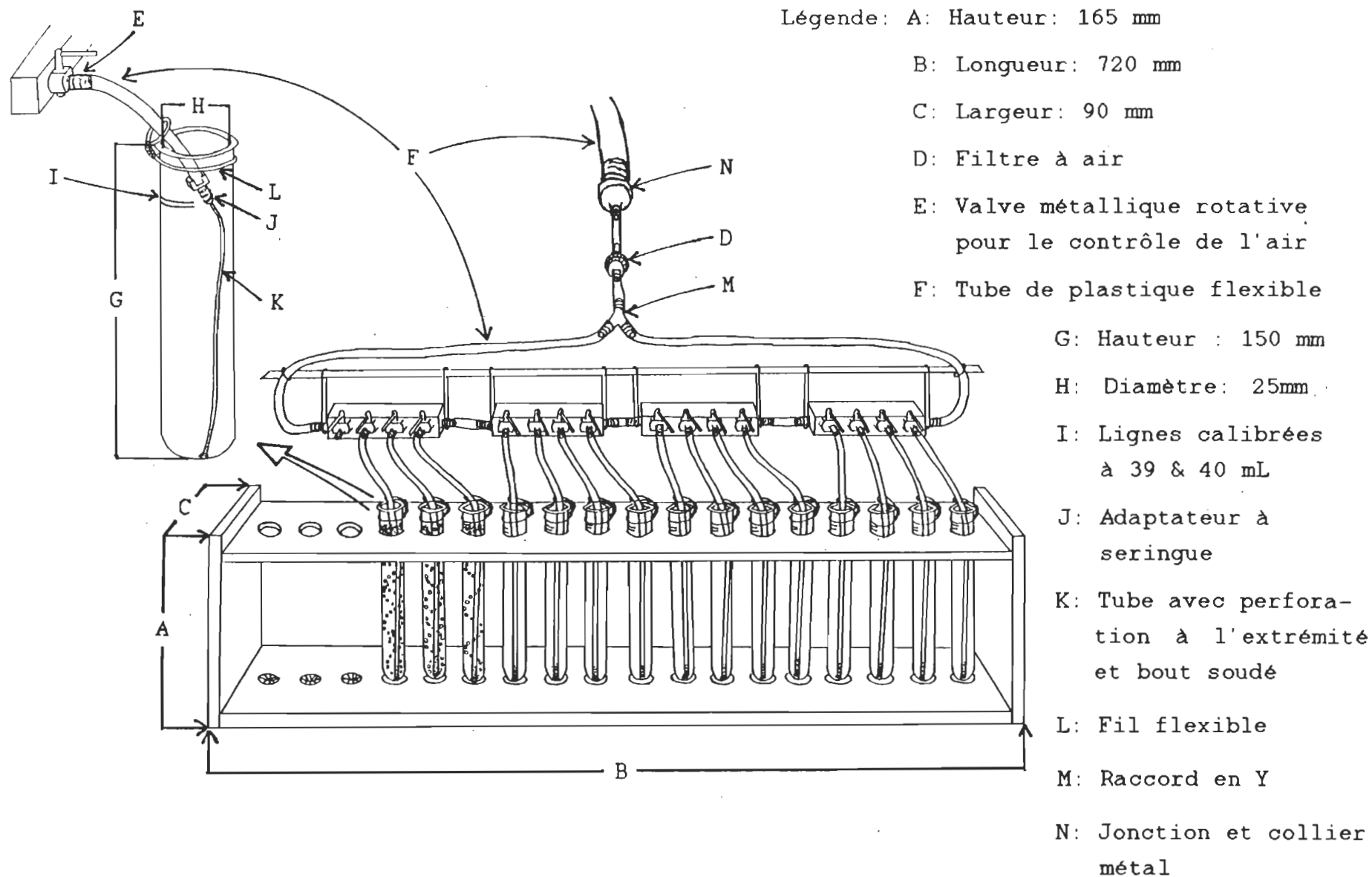


Fig.4: Système de traitement en tubes pour les larves de similies.

Certaines expériences (#5, #6 & #7) requièrent l'utilisation de nourriture (Nourriture pour poissons rouges: Nutra Fin). Les larves sont soumises à un temps d'adaptation relativement long avant le traitement. Il est donc préférable d'alimenter celles-ci afin de conserver les spécimens dans le meilleur état possible.

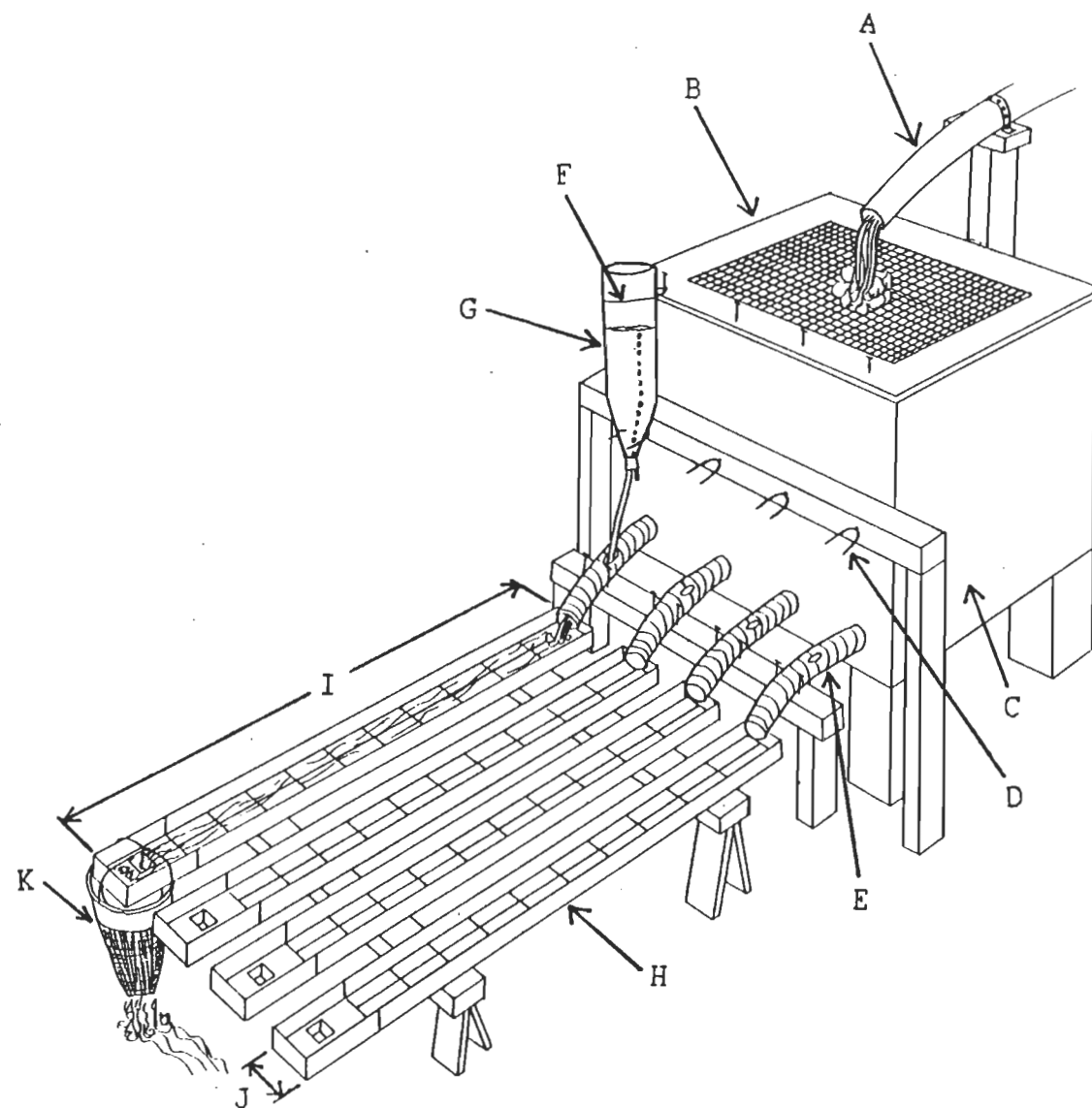
1.3. Application des extraits bruts sur le terrain, sur des larves de simules

Les traitements sur le terrain sont réalisés à la Réserve faunique du Saint-Maurice (voir Annexe II).

1.3.1. Système de traitement et colonisation des dalles

Les bioessais sont réalisés dans un système de gouttières (fig. 5) semblable à celui de Troubat (1981). La différence se situe au niveau du système de distribution du larvicide qui est constitué de bouteilles de Mariotte (fig.5, G). Cette amélioration permet une dispersion plus régulière de l'insecticide dans la dalle.

L'eau amenée au système par le tuyau d'alimentation provient du ruisseau à proximité du système. Les larves recueillies dans un cours d'eau sont déposées dans les dalles au moins 2 à 3 heures avant le traitement.



Légende:

- A: Alimentation pour l'eau de ruisseau
- B: Tamis à débris
- C: Bac de plastique
- D: Support pour bouteille de Mariotte
- E: Tuyau flexible
- F: Elastique
- G: Bouteille de Mariotte
- H: Gouttière de vinyle
- I: Longueur total 150 cm (140 cm + 10 cm)
- J: Largeur 8 cm
- K: Filet de dérive

Fig.5: Système de traitement en dalles pour les larves de simuliés.

Le débit d'eau dans les dalles est contrôlé grâce à des bouchons de liège (Diamètre supérieur: 35 mm, Fisher) entaillés. Ils sont insérés à l'intérieur du bac, dans les tuyaux (fig. 5, E) qui achemine l'eau dans les gouttières. De plus, pour faciliter le décompte des larves, le fond de celles-ci est divisé en 20 sections égales à l'aide d'un crayon indélébile à l'eau.

1.3.2. Détermination des concentrations à appliquer

C'est par comparaison à une formulation de Teknar HP-D[®] que les concentrations d'extraits bruts à appliquer sur le terrain sont déterminées. L'extrait semble être ingéré par les larves tout comme le Teknar HP-D[®].

1.3.2.1. Traitement avec le Teknar HP-D[®]

La formulation de Teknar HP-D[®] (Lot 0080227) a été préparée par la Compagnie Sandoz Inc. (Professional pest management, Zoëcon Corporation, Dallas, Texas) en 1985.

Une solution mère est préparée à raison de 1 mL de Teknar[®]/L d'eau de ruisseau. Le débit ($L \cdot s^{-1}$) de chaque dalle est évalué afin de déterminer la quantité nécessaire de solution mère pour avoir la concentration visée. Le temps de contact est d'une heure, ce qui correspond à 4 bouteilles de Mariotte se vidant régulièrement en 15 minutes chacune. Celles-ci sont calibrées pour contenir 1,5 litres/bouteille. Il s'agit donc d'introduire une certaine quantité

de solution mère, puis de compléter avec de l'eau de ruisseau jusqu'à la ligne de 1,5 litres.

Exemple de calcul:

Débit de la dalle X Concentration visée = Quantité à utiliser

$$0,15 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1} \quad \times \quad 40 \text{ mg} / \text{L}\cdot\text{s}^{-1} \quad = \quad 6 \text{ mg soit } 6 \text{ mL de sol.}$$

mère pour 4 bouteilles

La température lors du traitement varie de 10°C à 13°C. Le débit moyen est de 0,150 L·s⁻¹. Cependant, certaines dalles de débits différents (0,089 L·s⁻¹; 0,096 L·s⁻¹ et 0,168 L·s⁻¹) sont traitées avec une concentration identique de Teknar HP-D[®] afin de vérifier l'influence du débit lors d'un traitement. Toutes ces dalles obtiennent le même pourcentage de mortalité. La diminution du débit est donc possible lors de l'application de l'extrait brut, ce qui nous permet de diminuer la quantité de produit nécessaire pour le traitement.

Les mortalités sont estimées 24 heures après le début du traitement. A partir des résultats obtenus, la droite probit est tracée et différentes concentrations sont retenues (tableau 1).

1.3.2.2. Comparaison entre les résultats obtenus en laboratoire et sur le terrain avec le Teknar HP-D[®]

Des tests de comparaisons sont faits en laboratoire entre l'extrait brut (JD 263) et le Teknar HP-D[®], dans le système de

traitement en tubes. Ceci afin d'estimer par la suite les concentrations d'extraits bruts à utiliser en dalles sur le terrain. Cette comparaison est d'autant plus nécessaire qu'il a été noté des différences de sensibilité notables vis-à-vis le *B.t.i.* en termes de CL50 entre les larves de simuliés traitées au laboratoire et sur le terrain. Les CL50 sur le terrain étant toujours plus faibles que celles obtenues en laboratoire (Lacoursière, 1984).

Les traitements en dalles avec les extraits bruts sont réalisés avec un débit de $0,090 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui permet de réduire la quantité d'extraits à utiliser étant donné que nous ne disposons que de quantités limitées de produits pour effectuer les expériences sur le terrain.

Tableau 1
Résultats retenus pour la détermination des concentrations
d'extraits bruts à appliquer sur le terrain

Conditions expérimentales	% de Mortalité				
	28%	57%	75%	85%	91%
Teknar HP-D [®] sur le terrain ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(1)	0,005	0,007	0,010 (4)	0,012	0,014
Teknar HP-D [®] en laboratoire ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(2)	0,11	0,36	0,78 (4)	1,38	2,23
Extrait brut en laboratoire ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)(3)	50	80	110 (4)	140	170

- (1) Concentrations obtenues sur le terrain avec le Teknar HP-D[®].
Celles-ci ont été modifiées et correspondent maintenant à un débit de $0,090 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ et non à un débit de $0,150 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$.
- (2) Traitement en laboratoire avec le Teknar[®]. Temps de contact d'une heure, à une température de 13°C . La lecture de la mortalité est faite 24 heures après le début du traitement.
- (3) Valeurs tirées de l'expérience #7, 72 heures après la mise du produit. La température du traitement est de 9°C et le temps de contact avec les larves est d'une heure. Cependant, afin d'avoir un estimé plus précis des concentrations théoriques à appliquer, les valeurs obtenues avec les deux plus faibles concentrations n'ont pas été incluses dans le test statistique, ce qui modifiait la probabilité du test probit de 0,544 (toutes les concentrations) à 0,827 (sans les deux plus faibles concentrations).

Il suffit par la suite de calculer le rapport entre les différents résultats retrouvés dans le tableau 1. D'une part, le rapport entre l'efficacité de l'extrait brut en laboratoire et le Teknar HP-D[®] en laboratoire, et d'autre part entre l'efficacité du Teknar HP-D[®] en laboratoire et sur le terrain. Afin de minimiser les erreurs, les calculs sont effectués à partir du rapport entre les valeurs à 75% de mortalité (4). Puis, à l'aide des valeurs du traitement avec le Teknar[®] en laboratoire (2), les concentrations

sont déterminées selon de pourcentage de mortalité que l'on désire obtenir.

Exemple du calcul:

A. Comparaison entre l'extrait et le Teknar[®] au laboratoire

$$\begin{array}{ccc} \text{Concentration d'extrait} & \div & \text{Concentration de Teknar HP-D}^{\text{®}} \\ \text{en laboratoire} & & \text{en laboratoire} \\ 110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} & \div & 0,78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} = 141 \end{array}$$

Donc le Teknar[®] en laboratoire est 141 fois plus efficace que l'extrait.

B. Comparaison entre le Teknar[®] en laboratoire et sur le terrain

$$\begin{array}{ccc} \text{Concentration de Teknar HP-D}^{\text{®}} & \div & \text{Concentration de Teknar HP-D}^{\text{®}} \\ \text{en laboratoire} & & \text{sur le terrain} \\ 0,78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} & \div & 0,010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} = 78 \end{array}$$

Donc le Teknar[®] en laboratoire est 78 fois moins efficace que sur le terrain.

C. Détermination des concentrations d'extraits bruts à appliquer sur le terrain

En utilisant les rapports obtenus en A et en B, ainsi que les valeurs du tableau 1 avec le Teknar HP-D[®] en laboratoire (2), on arrive à déterminer les concentrations d'extraits bruts à utiliser pour une mortalité désirée. Cependant, ces concentrations comportent une certaine marge d'erreur, puisqu'aucun traitement n'a jamais été réalisé avec les extraits bruts dans des conditions naturelles. Ce sont donc des valeurs théoriques probables. Par conséquent, pour chaque bioessai, une fourchette de mortalités comprise entre 30% et 90% est réalisée avec les différents lots.

- Pour avoir 28% de mortalité:

$141 \times 0,11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ (Teknar}^{\text{®}} \text{ laboratoire)} \div 78 = 0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
soit un total de 64,8 mg d'extrait brut pour 324 L d'eau
(avec un débit de $0,09 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ pour 1 heure de traitement)

- Pour avoir 57% de mortalité: $141 \times 0,36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \div 78 = 0,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
soit un total de 226,8 mg d'extrait brut.

- Pour avoir 75% de mortalité: $141 \times 0,78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \div 78 = 1,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
soit un total de 453,6 mg d'extrait brut.

- Pour avoir 85% de mortalité: $141 \times 1,38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \div 78 = 2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
soit un total de 810,0 mg d'extrait brut.

- Pour avoir 91% de mortalité: $141 \times 2,23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \div 78 = 4,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
soit un total de 1 296,0 mg d'extrait brut.

1.3.3. Préparation des solutions d'extraits bruts

La quantité totale nécessaire pour un traitement en dalles d'une heure, avec un débit de $0,09 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$, est de 2 851,2 mg. La quantité d'extraits bruts utilisée est de 2 900 mg. Pour faciliter la préparation de la solution mère, la quantité est divisée en deux et déposée dans des erlemmeyers de 2 L. La proportion d'acétone est la même que mentionnée précédemment:

$1400 \text{ mg d'extrait} + 28 \text{ mL d'acétone} + 1372 \text{ mL d'eau} = 1,4\text{g} \cdot 1,4\text{L}^{-1}$
qui est la même proportion que la solution mère Teknar[®]. Par exemple, pour la dalle no.1 (28% de mortalité = 64,8 mg), 4 bouteilles reçoivent 16,2 mL de solution mère, soit 64,8 mL au total pour cette dalle.

1.3.4. Préparation de l'extrait brut (JD 264) avec les solutions de Na_2HPO_4 et de CaCl_2

La première solution est composée de $2,1 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ d'eau alors que la seconde comprend $55 \text{ g CaCl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ d'eau. Le pH des deux solutions est d'environ 7.

Lors de la préparation de la solution mère, 1,9 g d'extrait brut (JD 264) est dissous dans 37 mL d'acétone. Puis 1230 mL de la

solution Na_2HPO_4 est ajoutée, suivi de 633 mL de la solution CaCl_2 , ce qui provoque la formation d'un précipité (Miyake *et al.*, 1987).

1.3.5. Préparation du mélange Teknar HP-D[®] avec l'extrait brut

La solution mère de Teknar[®] est préparée de la même façon que précédemment. Cependant, la solution mère d'extrait utilisée ici est le surplus de la solution préparée 8 jours (Lot JD 261) auparavant et entreposée à 4°C.

Quatre bouteilles reçoivent du Teknar[®] et de l'extrait brut :

- 4 mL solution d'extrait + 0,53 mL solution Teknar[®] + 20 mL d'eau
- alors que quatre autres reçoivent seulement du Teknar[®] :
- 0,53 mL solution Teknar[®] + 24 mL d'eau.

Les 8 bouteilles sont ensuite laissées ainsi pendant 2 heures pour permettre un bon contact entre les deux produits. Puis, les bouteilles sont complétées à 1,5 litres et le traitement est effectué.

1.4. Application des produits en laboratoire, sur des larves de moustiques

1.4.1. Elevage du moustique *Aedes triseriatus*

Les larves de moustiques, *Aedes (Protomacleaya) triseriatus* (Say), sur lesquelles les expériences sont réalisées, proviennent

de l'élevage du Groupe de Recherche sur les Insectes Piqueurs de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

1.4.2. Protocole des bioessais sur *Aedes triseriatus*

1.4.2.1. Larves de 1er et de 3ième stades

Des oeufs de 2 semaines sont utilisés dans les expériences, afin de s'assurer que ceux-ci ont bien terminés la phase embryonnaire, qui est de 7 jours minimum (Munstermann, 1985). Une bande de papier (5 X 6 cm) sur laquelle les femelles ont déposé leurs oeufs, est placée dans une boîte de Pétri puis immergée dans 40 mL d'eau d.n.d. avec 15 mg de levure de bière (Bioforce Canada Ltée/ltd, Montréal, Québec). La levure provoque une baisse rapide d'oxygène et favorise l'éclosion.

Le papier est retiré après 1h30 pour obtenir une meilleure homogénéité dans l'âge et la taille des larves. Après 6 ou 7 heures, elles sont transférées dans un plateau en émaille (400 X 248 X 54 mm) avec 1,5 L d'eau d.n.d. et 2 à 3 mL de préparation de foie (Poudre de foie déséchée de boeuf, Swiss Herbal Remedies Ltd, Markham, Ontario) comme nourriture. Cette préparation de foie consiste à mélanger 1 g de foie à 16,66 mL d'eau d.n.d. (Munstermann, 1985). La température est de 21°C qui est la température optimale de croissance, et une photopériode de 18:6. A tous les 3 jours, le film bactérien à la surface de l'eau est enlevé avec un essuie-tout Kimwipes (Canlab) et de l'eau est

rajoutée pour le maintien du niveau initial. La même quantité de foie était rajouté à tous les 4 jours environ.

Après 6 à 7 jours, le stade désiré (3^{ième}) est atteint. Ceci est vérifié par un examen sous le microscope stéréoscopique (Canlab) de quelques spécimens avant chaque bioessai (Dodge, 1966; Smith, 1969; Savignac et Maire, 1981; Wood, 1984). Ce stade qui est l'avant dernier avant la nymphose, offrait comme avantages, une faible mortalité dans les témoins tout en présentant des effets évidents avec les produits. Rashed et Mulla (1989) démontrent dans leur étude que plus la larve est jeune plus celle-ci ingère rapidement la nourriture par rapport aux stades plus vieux. Elles sont donc plus susceptible d'être affectées par les toxines. Le troisième stade est, comme le mentionne Merritt (1987), un stade qui s'alimente de particules de différentes grosseurs contrairement au premier et deuxième stades larvaires.

Une seule expérience est réalisée (expérience #20) avec des larves de 1^{er} stade (24 heures après l'éclosion). C'est suite à deux tests préliminaires réalisés sur des larves de 3^{ième} stade (expériences #18 et #19), que la sensibilité des larves de 1^{er} stade vis-à-vis la destruxine E nous a semblé intéressante, puisque cela permet l'utilisation de concentrations moins importantes de destruxine E, tout en recueillant des informations additionnelles. Par la suite, ces résultats peuvent devenir un élément supplémentaire pouvant faciliter la compréhension du mode d'action des extraits bruts sur les larves d'*Aedes triseriatus*.

Lors d'un bioessai, 45 ou 50 larves sont comptées et déposées avec un compte-gouttes dans chaque pot (boîte de rangement en pyrex (Canlab)) avec un peu d'eau d.n.d.. Deux ou trois pots sont préparés pour chaque concentration. Puis, une quantité déterminée de solution mère est ajoutée à cette eau. Des témoins acétones et des témoins sont préparés à chaque bioessai. On ajuste ensuite tous les niveaux d'eau à la ligne de 100 mL marquée préalablement sur le pot avec un crayon indélébile. La densité de larves par pot correspond à celle de l'élevage (Munstermann, 1985).

Afin d'éviter une augmentation de la mortalité, seulement les larves mortes sont enlevées à chaque jours alors que le décompte final des survivantes est fait à la fin du bioessai. Les pots sont écumés lorsqu'un film bactérien est présent et le niveau d'eau est maintenu à 100 mL. Les bioessais s'échelonnent la plupart du temps jusqu'à l'émergence des larves. Dès qu'il y a des nymphes, une petite moustiquaire maintenue par un élastique est placée sur le pot.

1.4.2.2. Larves néonates

Deux genres d'expériences différentes sont réalisées avec les larves néonates. La réponse rapide de celles-ci lorsqu'elles sont exposées aux produits toxiques donne un bon indice quant à l'efficacité des substances utilisées. Elles se sont avérées très constantes et précises lors de tests de toxicité réalisés avec du *B.t.i.* (Tousignant *et al.*, accepté).

Elles sont utilisées ici pour vérifier l'effet possible sur la croissance avec la destruxine E. Elles sont également utilisées pour la détermination des concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts (JD 261, JD 263 et JD 264).

1.4.2.2.1. Effet sur la croissance des larves néonates

Les larves néonates utilisées dans l'expérience sont âgées d'une heure. Pour les besoins de l'expérience, les oeufs sont soumis à deux méthodes différentes pour l'éclosion. La première par l'utilisation de levure telle que décrite précédemment (1.4.2.1) et la seconde à partir de 40 mL d'eau d.n.d. déoxygénée. L'eau est placée dans un dessiccateur à vide (Fisher) pendant 30 minutes puis les oeufs sont déposés dans celle-ci sans levure.

Après une heure, les larves sont déposées dans les cupules de trois plaques à cultures tissulaires Falcon (96 puits, Fisher) à l'aide de micropipettes (Finnpipette Digital 5-40 μ L; SMI Airpettor 40-200 μ L)(Canlab) (tableau 2). L'embout (Capacité: 1-250 μ L) est coupé à son extrémité afin d'avoir une plus grande ouverture pour éviter les blessures aux larves.

Pour chaque plaque, le témoin, le témoin acétone ou les larves traités occupent chacun 3 rangées (8 cavités/rangée). Pour éviter l'évaporation, des couvercles sont placés sur les plaques. Elles sont ensuite entreposées dans une étuve à 21°C. Après 96 heures d'observation, toutes les larves sont fixées dans de

l'alcool 95%. Par la suite, elles sont mesurées et les stades larvaires sont déterminés.

Tableau 2
Conditions expérimentales lors du traitement avec
la destruxine E, sur des larves néonates

Plaquette A	Plaquette B	Plaquette C
- Larves éclosent dans l'eau déoxygénée	- Larves éclosent dans l'eau déoxygénée	- Larves éclosent dans l'eau et levure
- 1 larve + 95 μ L par puit	- 1 larve + 100 μ L par puit	- 1 larve + 100 μ L* par puit
- puis rajout de 100 μ L d'eau ou de solution mère et de 5 μ L de solution de foie dans chaque puit	- puis rajout de 100 μ L d'eau ou de solution mère dans chaque puit	- puis rajout de 100 μ L d'eau ou de solution mère dans chaque puit

* Le 100 μ L de liquide prélevé lors de la capture de la larve contient une certaine quantité de levure mais varie d'un puit à l'autre.

1.4.2.2.2. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec des larves néonates

La méthode utilisée pour cette expérience est identique à celle expliquée précédemment dans la section 1.4.2.2.1. pour la

plaquette C. Le nombre de larves testé est cependant différent et se réfère à la méthode utilisée par Ibarra et Federici (1987).

Chaque témoin, témoin acétone ou concentration sont représentés par 4 rangées (8 cavités/rangée) soit 32 larves par témoin ou concentration. Dans cette même expérience, des triplicats sont réalisés ce qui signifie que le nombre total correspond à 96 larves par témoin ou concentration.

Puisqu'aucune expérience n'a été réalisée précédemment avec les extraits sur des larves néonates, les concentrations utilisées vont de 8 ppm à 512 ppm (concentrations utilisées: 8; 16; 32; 48; 64; 96; 128; 192; 256; 320; 512) afin de recueillir le plus d'information possible.

1.4.3. Mesure de la longueur des larves néonates ou de 3ième stade

Fixées dans l'alcool 95%, les larves sont déposées dans une boîte de Pétri en verre et mesurées (fig. 6) sous le microscope stéréoscopique à 10X ou 40X. L'échelle de l'oculaire est vérifiée (10X: 10 unités = 1 mm et 40X: 39 unités = 1 mm) avec un micromètre de platine (Canlab).

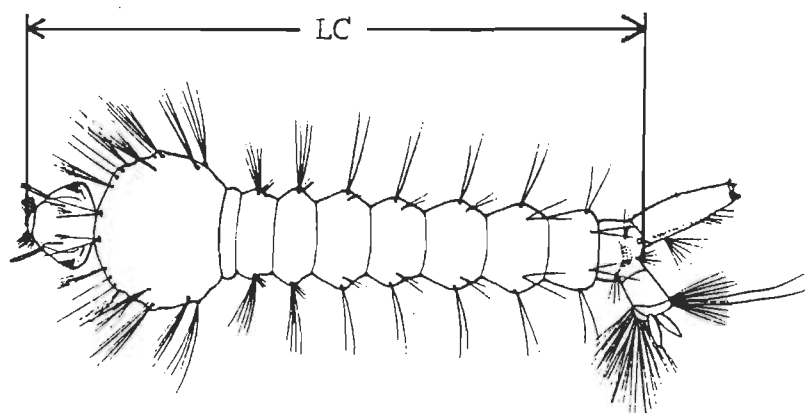


Fig. 6 : Mesure de la longueur (LC = Longueur du corps) des larves d'*Aedes triseriatus*.

1.5. Nettoyage de la vaisselle

Les béciers, les tubes, les pots ainsi que les instruments sont nettoyés avec du savon et de l'eau de javel puis rincer à l'eau. Une fois secs, ceux-ci sont remplis avec de l'acide sulfochromique pur ou trempés dedans. Après 5 minutes, l'acide est enlevé, puis un rinçage est soigneusement effectué avec de l'eau déminéralisée. Cette précaution s'avère nécessaire lors de l'emploi de l'extrait brut ou enrobé car d'importants dépôts graisseux adhèrent aux matériels utilisés. En ce qui concerne les diffuseurs à air (pour les simules), ils sont immergés dans un solvant (l'alcool 95%) pendant 30 minutes puis rincés à l'eau déminéralisée.

Dans le cas de l'utilisation de la destruxine E, la vaisselle est lavée avec de l'eau et du savon puis rincer plusieurs fois à l'eau (eau du robinet et eau déminéralisée).

1.6. Traitements statistiques des données

La transformation d'une variante peut avoir pour intérêt de fournir une relation plus simple avec une deuxième variante que ne le fait la forme non transformée. Elle est très employée en toxicologie, en expérimentation biologique et dans des travaux où la réponse est tout ou rien (Mather, 1965; Finney, 1971). Ainsi, en utilisant la transformation de probit nous obtenons une relation linéaire entre la mortalité (exprimée en probit) et le logarithme de la concentration alors qu'elle aurait été sigmoïdale sans transformation. La procédure PROBIT du programme informatisé SPSS^X Release 2.0 permet d'effectuer cette analyse.

D'autres tests statistiques sont employés. Le test de t, permet de calculer le t de Student et de vérifier si deux moyennes diffèrent de façon significative. Le test du Khi carré, lui, consiste à mesurer l'écart qui existe entre des fréquences observées et des fréquences attendues (ou théoriques) et à tester si cet écart est suffisamment faible pour être imputable aux fluctuations d'échantillonnage (Scherrer, 1984). Ces analyses sont effectuées par les commandes T-Test et Crosstabs applicable dans le programme informatisé SPSS^X Release 2.0.

Le programme SPSS^x Release 2.0 est exploité par le centre de calculs et d'analyses du service informatique de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

2. RESULTATS

Ce chapitre se divise en deux grandes parties. Dans la première partie, nous compilons les résultats obtenus en laboratoire ainsi que sur le terrain, chez des larves de simuliés mises en contact avec les extraits bruts. La seconde partie englobe les données recueillies chez des larves de moustiques exposées aux extraits bruts, ainsi qu'à la destruxine E. L'annexe IV comprend les résultats bruts, et également les conditions expérimentales spécifiques à chaque expérience. De plus, l'expérience #21 est décrite entièrement dans ce chapitre.

2.1. Larves de simuliés

2.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*

Chaque figure qui suit, présente une ou plusieurs droites de régression. A partir de cette droite, on peut déterminer la concentration de produit nécessaire pour obtenir le pourcentage de mortalité désiré. Pour construire une telle droite, chaque valeur obtenue lors d'un bioessai, doit être pondérée dans le calcul de la ligne de régression du probit par rapport au logarithme de la

concentration. On s'attend donc à ce que les points se trouvent sur cette droite dans les limites de l'erreur d'échantillonnage. Cette relation est vérifiée par une analyse de régression et par un χ^2 (Mather, 1965). Lorsque cette relation est plus ou moins forte, c'est-à-dire dès que la probabilité est inférieure à 0,05 (pour le χ^2), le test signale une hétérogénéité entre les valeurs obtenues et la droite.

2.1.1.1. Résultats obtenus en laboratoire

Des tests préliminaires ont été réalisés avec les destruxines A et E par le Dr. Guy Charpentier lors de son séjour en France en 1985 et 1986. Des temps de contact de 24 heures avec les larves de simuliés étaient nécessaires, puisque celui-ci n'avait obtenu que très peu de mortalité avec des temps de contact plus court.

Tout d'abord, il est important d'établir quelles sont les concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*. Tout comme le Dr. Charpentier, il faut évaluer le pouvoir toxique des produits. Ainsi, certaines expériences sont réalisées avec un temps de contact relativement long (24 heures), alors que d'autres comportent un temps de contact plus court (1 heure). Ce temps de contact d'une heure seulement est plus convenable pour une application éventuelle sur le terrain.

Quatre expériences (#1, #2, #3, #4) sont réalisées avec un temps de contact de 24 heures et trois (#5, #6 et #7) avec un temps de contact d'une heure, avec le lot JD 263 (tableau 3). Le temps de lecture des mortalités peut aller jusqu'à 48 heures et même 72 heures dans le cas de l'expérience #7. Ces temps de lecture sur une longue période sont nécessaires pour vérifier les effets à long terme de l'extrait.

Tableau 3

Éléments spécifiques aux différentes expériences en laboratoire

Expériences (Temps de contact)	Provenances des larves	Espèces	Densités	Températures de traitements
#1 (24h)	Lac Garand	92% <i>S. venustum</i> / <i>verecundum</i> 7% <i>S. sp</i> 1% <i>S. decorum</i>	30 l/250mL	16,5°C
#2 (24h)	Lac Inman Est	61% <i>S. venustum</i> / <i>verecundum</i> 38% <i>S. decorum</i> 1% <i>S. tuberosum</i>	50 l/250mL	16,5°C
#3 (24h)	Lac des Souris	85% <i>S. venustum</i> / <i>verecundum</i> 15% <i>S. decorum</i>	30 l/250mL	16,5°C

Tableau 3 (suite)

Éléments spécifiques aux différentes expériences en laboratoire

Expériences (Temps de contact)	Provenances des larves	Espèces	Densités	Températures de traitements
#4 (24h)	Lac Garand	100% <i>S. decorum</i>	30 l/250mL	16,5°C
#5 (1h)	Lac Bélanger	88% <i>P. mixtum</i> 12% <i>C. mutata</i>	40 l/40mL	13°C
#6 (1h)	Lac Bélanger	88% <i>P. mixtum</i> 12% <i>C. mutata</i>	40 l/40mL	13°C
#7 (1h)	Lac Bélanger	88% <i>P. mixtum</i> 12% <i>C. mutata</i>	40 l/40mL	9°C

Cependant, certains résultats ne peuvent être analysés (mortalité trop faible ou trop forte, manque de données) mais chaque expérience peut nous fournir suffisamment de données pour construire une droite pour chaque bioessai. Les droites varient donc selon le temps de lecture des mortalités, qui débute dès la mise en contact de la solution avec les larves (fig. 7).

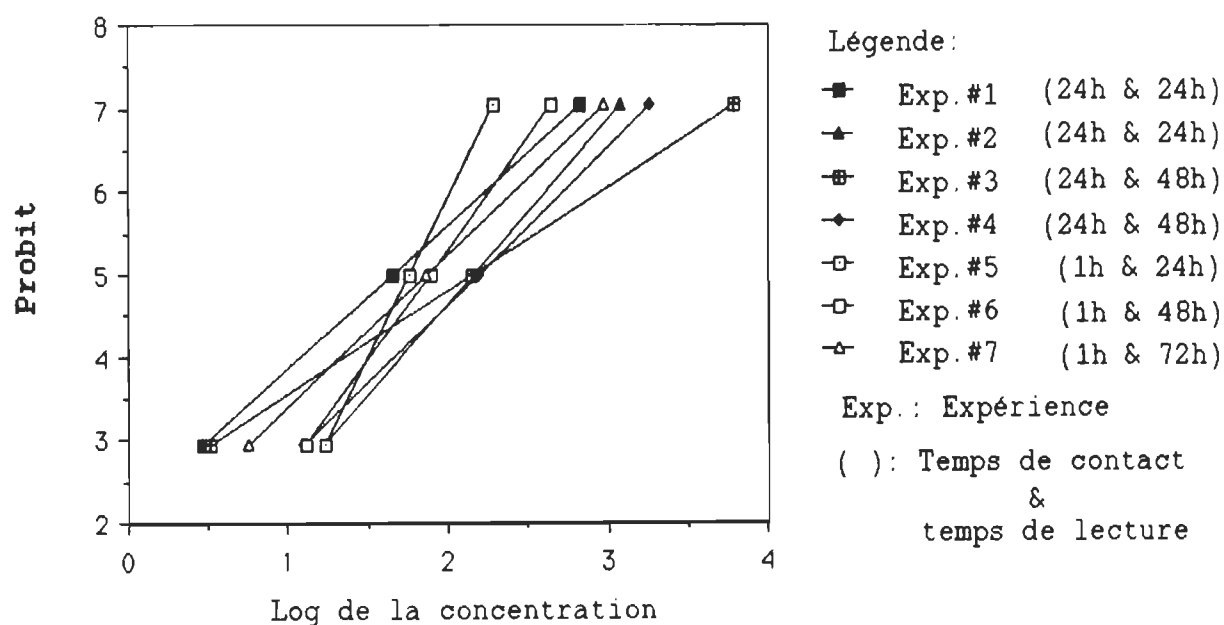


Fig.7: Droites calculées à partir des valeurs obtenues après des temps de contact et de lecture différents.

Les concentrations létales 50 et 90 sont comparées par un test de t de student afin de déterminer si elles sont relativement proches les unes des autres. Tout d'abord, la moyenne de la concentration létale 50 des expériences #1 et #2 est comparée avec celle des expériences #3 et #4. L'analyse démontre qu'il n'y a pas de différence significative ($P:0,41$) entre les concentrations létales 50 obtenues après un temps de lecture des mortalités de 24 heures et de 48 heures. Il en est de même pour la concentration létale 90.

Puis, les moyennes des concentrations létales 50 pour les temps de contact d'une heure (#1, #2, #3 et #4) et de 24 heures (#5, #6 et #7) sont comparées entre elles. Il en ressort encore une fois aucune différence significative apparente entre ces moyennes.

Le même test est effectué avec les moyennes des concentrations létales 90 et la réponse est identique ($P:0,095$).

Bien qu'aucune différence significative n'est décelée entre les diverses données obtenues, il est possible que des différences entre les résultats soient masquées par les autres éléments tels que les espèces, la température de traitement, la densité, etc.

Puisque l'ensemble des valeurs obtenues dans les sept bioessais sont statistiquement similaires, l'élaboration d'une droite regroupant toutes les données semble appropriée. Cela permet de mieux visualiser les concentrations nécessaires lors d'un traitement en laboratoire où le temps de contact correspondrait à 1 heure et où le temps de lecture serait de 24 heures (fig. 8).

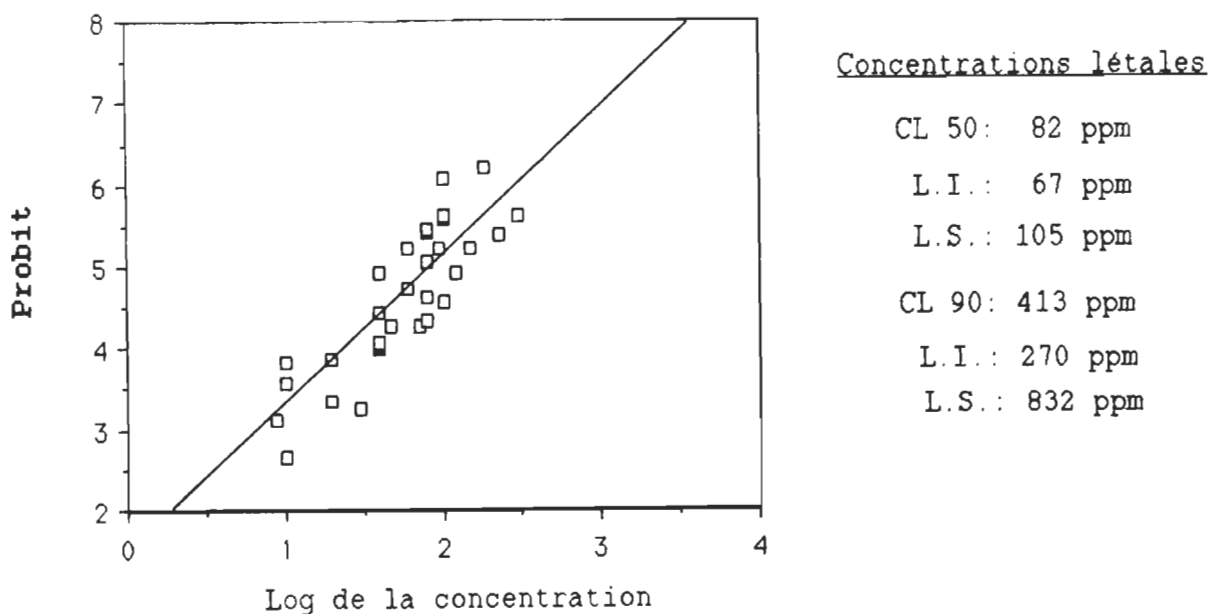


Fig.8: Valeurs obtenues (\square ; $N = 32$) en laboratoire et droite obtenue après analyse des données.

2.1.1.2. Résultats obtenus sur le terrain avec les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*

Les résultats positifs lors des bioessais en laboratoire, pour un temps de contact d'une heure avec l'extrait brut JD 263, nous ont incité à réaliser des tests préliminaires sur le terrain.

La première expérience (#8) réalisée avec le lot JD 261 comprend un temps de lecture des mortalités allant jusqu'à 72 heures (fig. 9). Ceci afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'effet à retardement du produit vis-à-vis les larves.

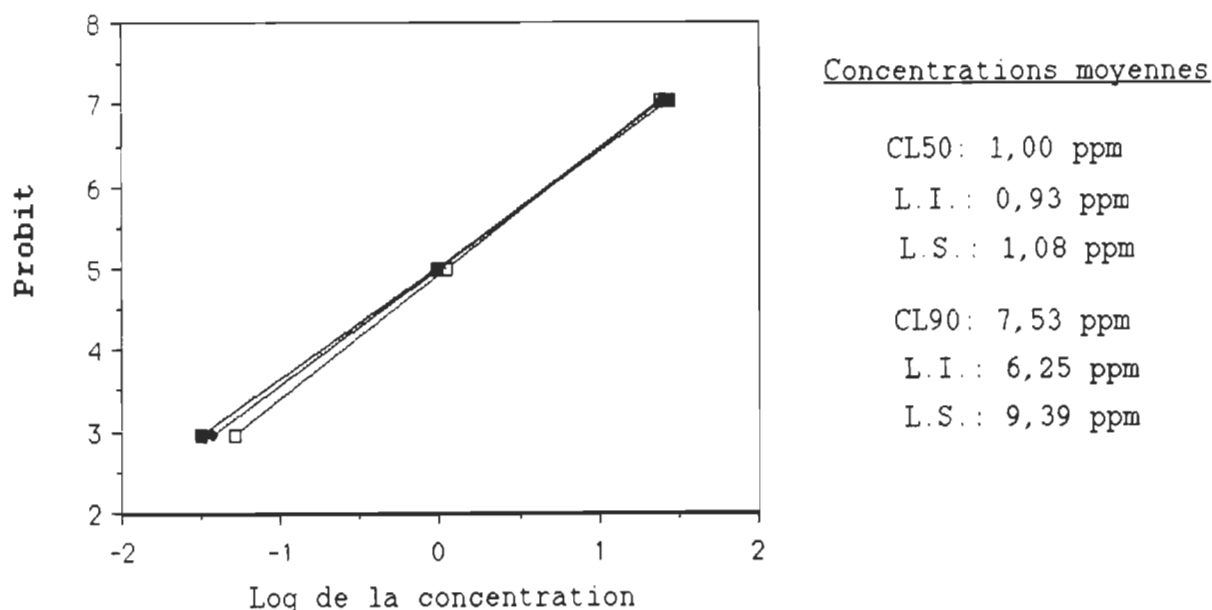


Fig.9: Droites obtenues après l'analyse des données recueillies lors des lectures des mortalités de 24, 48 et 72 heures.

Il est important de noter que les droites de la figure 9 sont le résultat de l'analyse de seulement quatre des cinq

concentrations testées (0,18; 0,69; 1,28 et 2,46 ppm). Les résultats obtenus avec la plus forte concentration (3,93 ppm) sont semblables à ceux recueillis avec 2,46 ppm, ce qui affectait quelque peu l'analyse des données.

Les valeurs obtenues sont pratiquement identiques malgré les trois temps de lecture différents. Ainsi, la réponse des larves mises en présence de l'extrait brut peut être observée dans les 24 heures suivant l'application du produit.

Un deuxième traitement (#9) est réalisé afin d'évaluer le potentiel du lot JD 263. La faible quantité de produit ne permet que le traitement d'une seule dalle. D'après les droites obtenues (fig. 9) avec le lot JD 261, la concentration (0,12 ppm) utilisée lors de ce second bioessai doit provoquer une mortalité d'au moins 10%. Cependant, la réponse obtenue après 48 heures d'observation (2%) n'est guère plus élevée que la mortalité du témoin (1%).

Un troisième traitement (#10) est répété dans les mêmes conditions que le premier. Cependant, le lot utilisé est différent (JD 264) car le lot précédent (JD 261) est presque entièrement épuisé. Bien que l'observation s'étale sur une période de plus de 48 heures, aucune mortalité significative (Concentration maximum utilisée dans le traitement #10: 4 ppm: 1% de mortalité) par rapport au témoin n'est décelée lors du bioessai.

Enfin, un dernier traitement (#11) est effectué avec le lot JD 264. Cependant, la solution mère a subi quelques modifications (Solutions de Na_2HPO_4 et de CaCl_2) afin de vérifier s'il est possible d'augmenter l'efficacité du produit. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de l'expérience #10.

2.1.1.3. Traitement avec le Teknar HP-D[®] et l'extrait JD 261 sur le terrain

Avec le reste de la solution de l'expérience précédente (#8, Lot JD 261), on veut vérifier s'il peut exister un effet de synergisme avec un autre insecticide (#12). Le choix s'est arrêté sur le Teknar HP-D[®] puisqu'il a déjà été employé pour déterminer les concentrations d'extraits bruts à appliquer sur le terrain.

Tableau 4
Résultats obtenus après 1 heure de contact et 24 heures d'observation pour l'expérience #12

Concentrations		Mortalités après 24 heures
Témoin		16 m/824 (2%)
<u>Traitement A:</u> (Exp. #12)	Teknar [®] 0,0065 ppm	77 m/606 (13%)
<u>Traitement B:</u> (Exp. #8)	Extrait 0,0494 ppm*	12 m/606 (2%)
<u>Traitement C:</u> (Exp. #12)	Teknar [®] 0,0065 ppm + Extrait 0,0494 ppm	171 m/977 (18%)

* Valeur obtenue d'après la droite probit de 24 heures, à partir des données de l'expérience #8 en dalle, avec les 4 concentrations suivantes: 0,18; 0,69; 1,28 et 2,46 ppm.

A l'aide du test du χ^2 , il s'agit de déterminer si la proportion de mortalité du traitement C (171m/977 (18%)) est significativement différente lorsqu'on regroupe ensemble les valeurs du traitement A et du traitement B (89m/606 (15%)).

La valeur obtenue (P:0,14) après l'analyse est supérieure à 0,05. L'hypothèse nulle est alors acceptée. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux proportions. Il s'agit donc d'un effet additif puisque qu'aucun effet de synergisme entre ces deux produits n'est mis en évidence.

2.2. Larves de moustiques (*Aedes triseriatus*)

2.2.1. Résultats obtenus avec les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*

Les larves de moustiques sont exposées en permanence aux extraits bruts, puisqu'en milieu naturel, elles vivent dans des eaux stagnantes.

2.2.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90
sur des larves néonates

L'expérience #13 permet de vérifier s'il est possible d'obtenir des résultats intéressants et constant avec les extraits, sur une courte période d'observation. Les trois lots d'extraits bruts sont testés sur des larves néonates (fig. 10). La lecture des mortalités est effectuée 24 heures après la mise des produits.

Bien que ce type de bioessais a été utilisé avec le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* et s'est avéré très constant (Tousignant *et al.*, accepté), il n'en ait pas de même pour les valeurs obtenues avec les extraits bruts. En effet, les tests probit indique tous une hétérogénéité ($P: 0,000$) entre les valeurs obtenues et la droite probit (fig. 10. a, b et c) et cela même si le nombre de larves utilisées pour chaque concentration s'élève à 96.

Les droites probit ont été comparées entre elles par des tests de χ^2 pour vérifier le parallélisme entre les trois droites (fig.10 d) et les CL 50. Le parallélisme entre les droites n'est pas significativement différent puisque la valeur obtenue est inférieure à la valeur limite ($3.112 < 5.99$; d.f.:2). Cependant les CL50 sont significativement différentes d'après le test ($7.074 > 5.99$; d.f.:2).

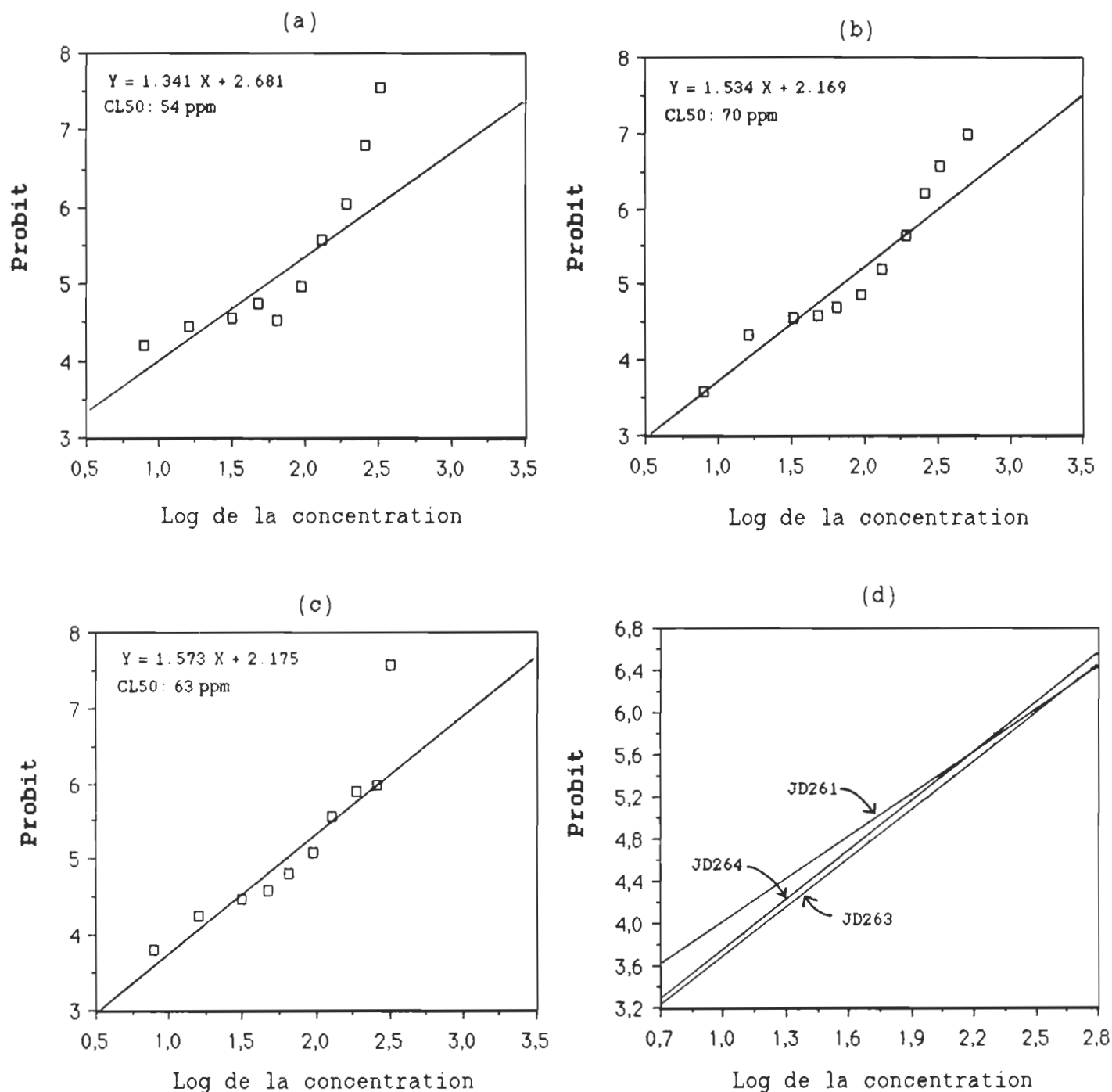


Fig 10: Valeurs obtenues (\square ; $N = 10$ ou 11) avec des larves néonates exposées aux extraits bruts, (a) JD261, (b) JD263, (c) JD264. La droite et l'équation probit ainsi que la CL50 sont indiquées pour chaque extrait. Afin de faciliter l'interprétation, les droites ont également été regroupées (d).

Par la suite, un autre test de χ^2 est réalisé mais cette fois-ci entre les CL50 des lots JD 263 et JD 264 et le parallélisme des droites probit. Aucune différence significative n'existe entre les deux pentes ($0.077 < 3.84$; d.f.:1) ou entre les CL50 ($1.500 < 3.84$; d.f.:1) car les valeurs calculées sont inférieures à la valeur limite.

2.2.1.2. Détermination des concentrations létales 50 et 90 sur des 3 ième stade

Les lectures des mortalités pour les expériences qui vont suivre s'échelonnent sur une plus longue période, afin de mieux connaître les effets à long terme des produits. Deux expériences (#14 et #15) sont réalisées avec l'extrait brut JD 263 et l'extrait JD 263 enrobé dans de l'amidon, alors qu'une autre (#16) est réalisée avec l'extrait brut JD 264.

Les résultats obtenues avec le lot JD 263 sont d'abord analysés et représentés par les figures 11, 12, 13 et 14.

La figure 11 comprend les droites probit de l'extrait JD 263 et de l'extrait JD 263 enrobé pour les deux expériences (#14 et #15) après 11 jours d'observation. En effet, les mortalités semblent se stabiliser après ce laps de temps, comme on a pu le constater lors des lectures des mortalités.

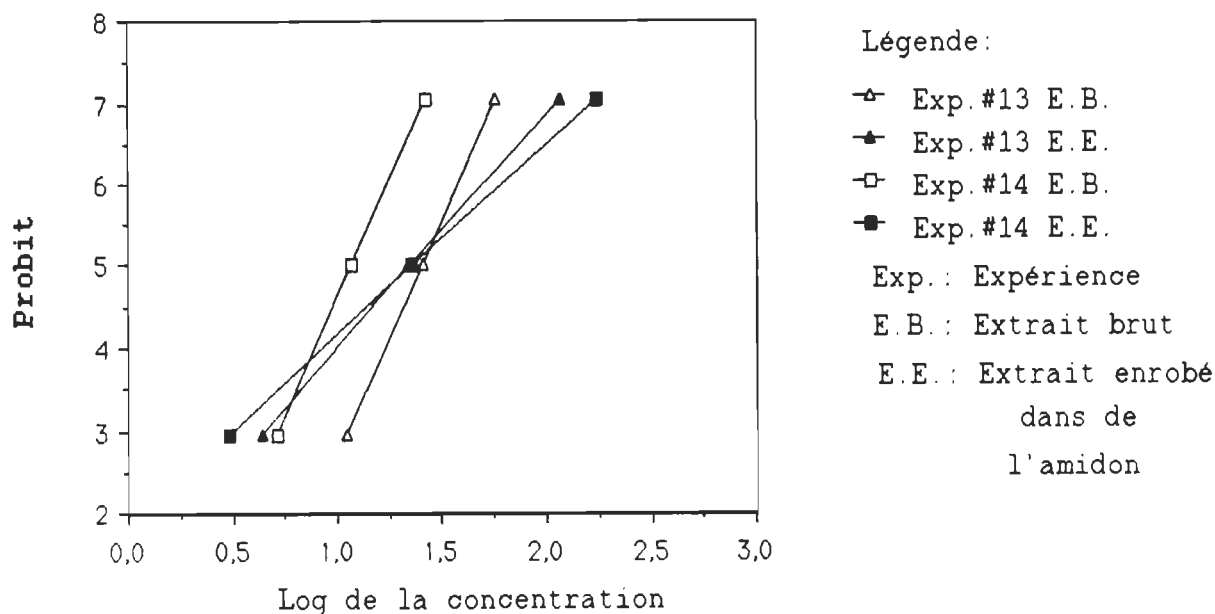


Fig.11: Résultats obtenus après 11 jours, avec l'extrait JD263 et avec l'extrait JD263 enrobé dans de l'amidon.

Les moyennes des concentrations létales 50 pour l'extrait brut et l'extrait enrobé d'amidon sont comparées à l'aide d'un test de t, afin de vérifier s'il y a une différence significative entre ces deux moyennes. Les tests indiquent qu'il n'existe pas de différence entre les moyennes. Il en est de même pour les concentrations létales 90.

L'enrobage de l'extrait JD 263 dans de l'amidon ne semble pas être très avantageux comme l'on a pu le supposer auparavant. Puisqu'il n'y a pas de différences entre les données, les résultats obtenus avec l'extrait brut JD 263 sont utilisés pour calculer une seule droite probit (fig. 12).

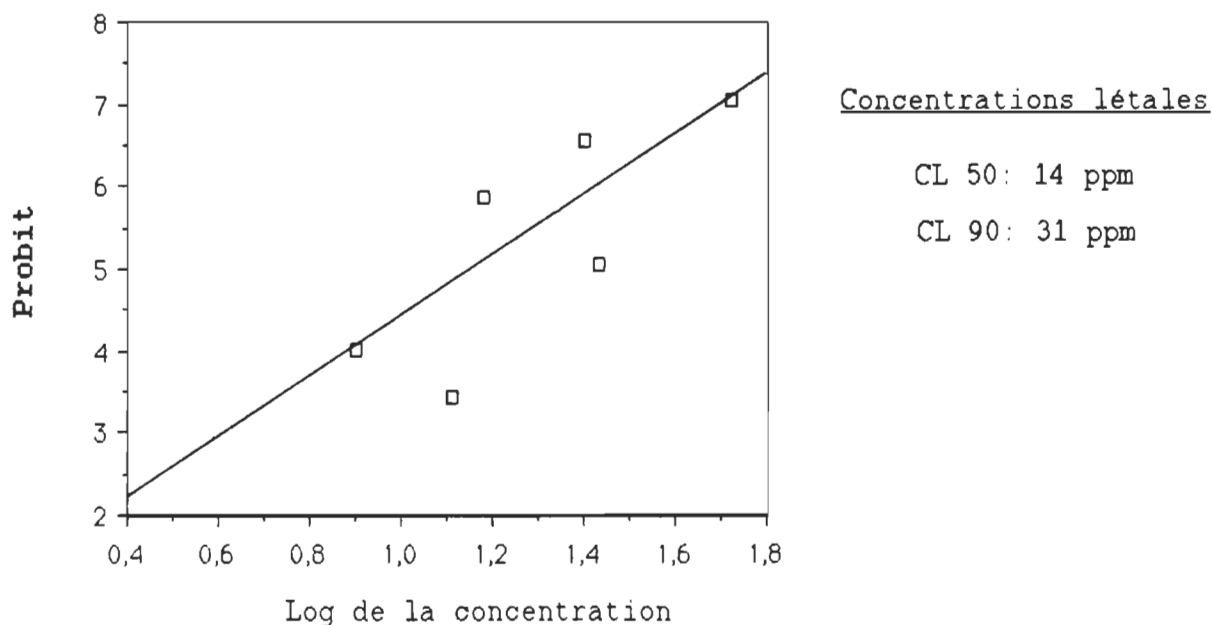


Fig.12: Valeurs obtenues (\square ; N = 6) avec l'extrait JD263 pour les expériences #14 et #15 après 11 jours de contact.

Afin de bien visualiser les effets de l'extrait brut JD 263 sur une longue période, les droites probit calculées selon différents temps d'observation sont regroupées, de même que les concentrations létales 50 et 90, et cela pour l'expérience #14 (fig.13) et l'expérience #15 (fig.14). Cependant, les concentrations létales 50 et 90 avant 4 jours ne peuvent être calculées puisque la mortalité est très faible ou sinon nulle, même pour les concentrations les plus fortes (53 ppm). On peut donc supposer que pour obtenir des mortalités dans les quatre premiers jours, les concentrations à employer sont très élevées.

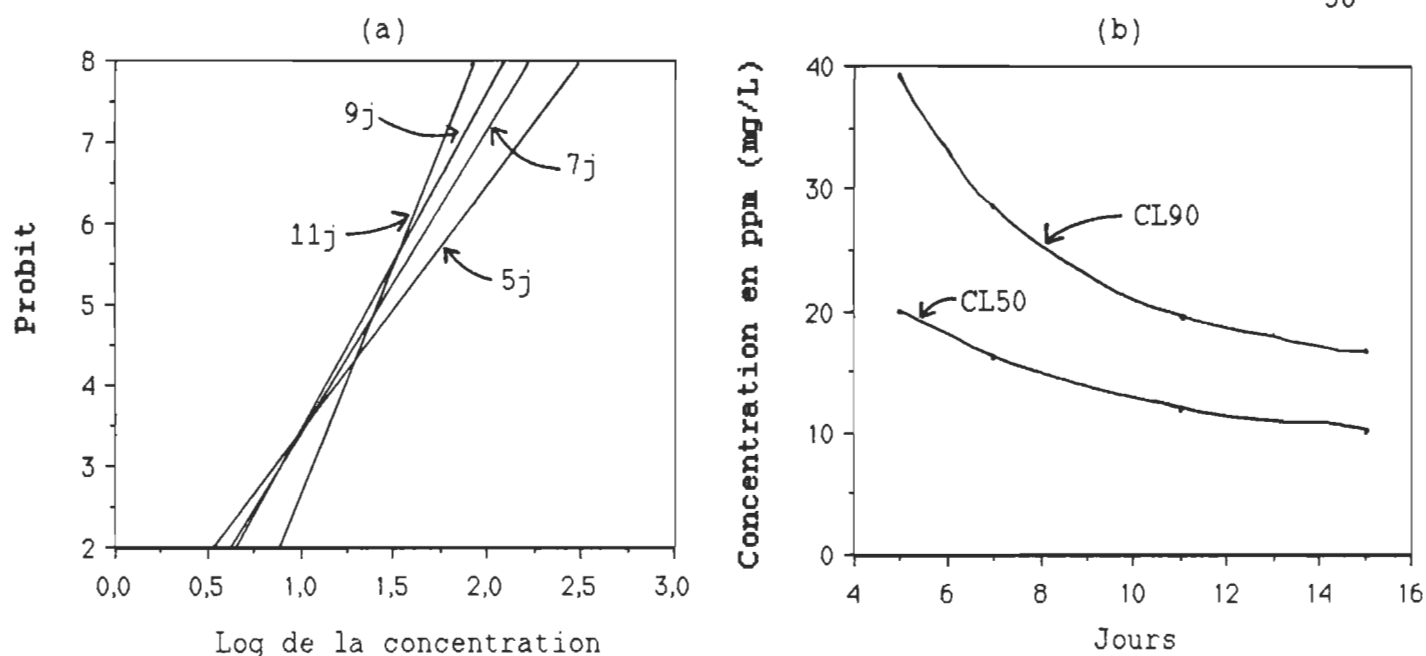


Fig.13: Compilation des droites probit obtenues avec le lot JD263 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #14.

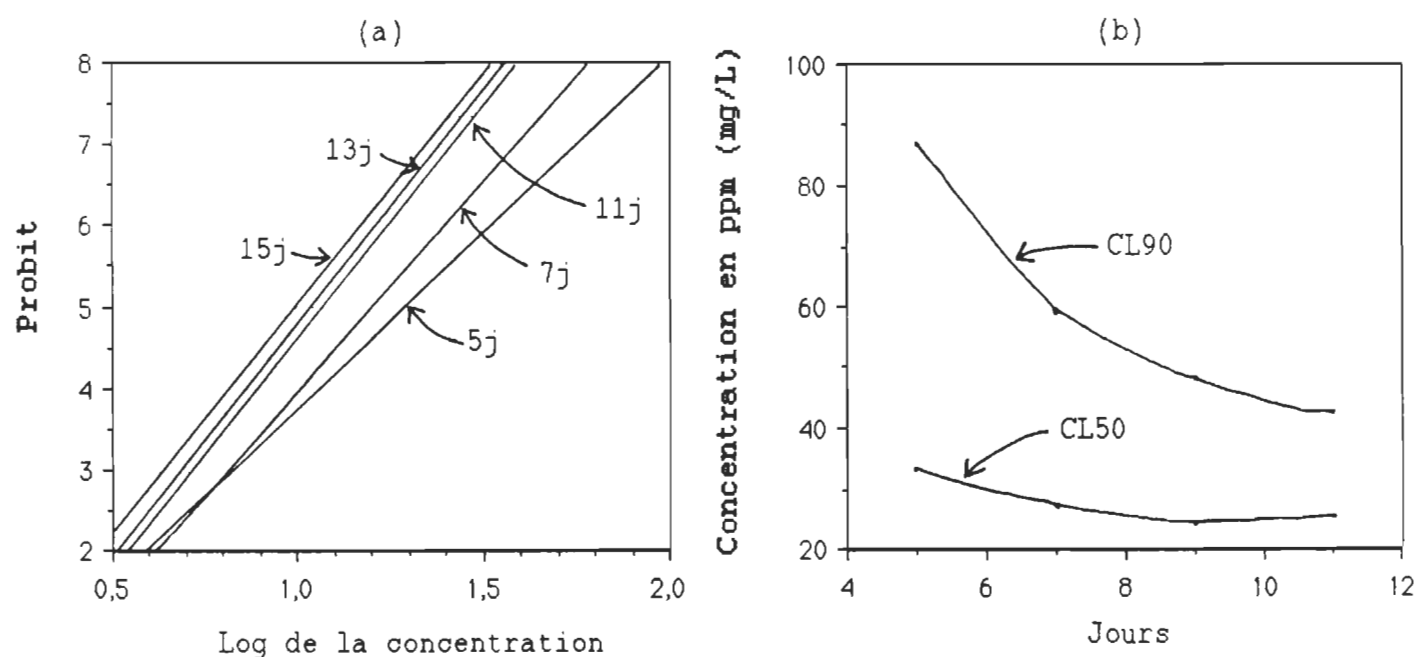


Fig.14: Compilation des droites probit obtenues avec le lot JD263 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #15.

L'interprétation globale des résultats retrouvés dans les figures 13 et 14 démontre que l'effet toxique du lot JD 263 doit être observé à long terme. Les concentrations létales diminuent avec le temps et les droites probit se déplacent également selon le temps d'observation.

Les résultats de l'expérience #16 sont inclus dans les figures 15 et 16. La figure 15 représente les résultats obtenus avec l'extrait brut JD 264, après un temps d'observation de 11 jours ainsi que la droite probit. Là encore, les mortalités se sont stabilisées après ce temps d'observation.

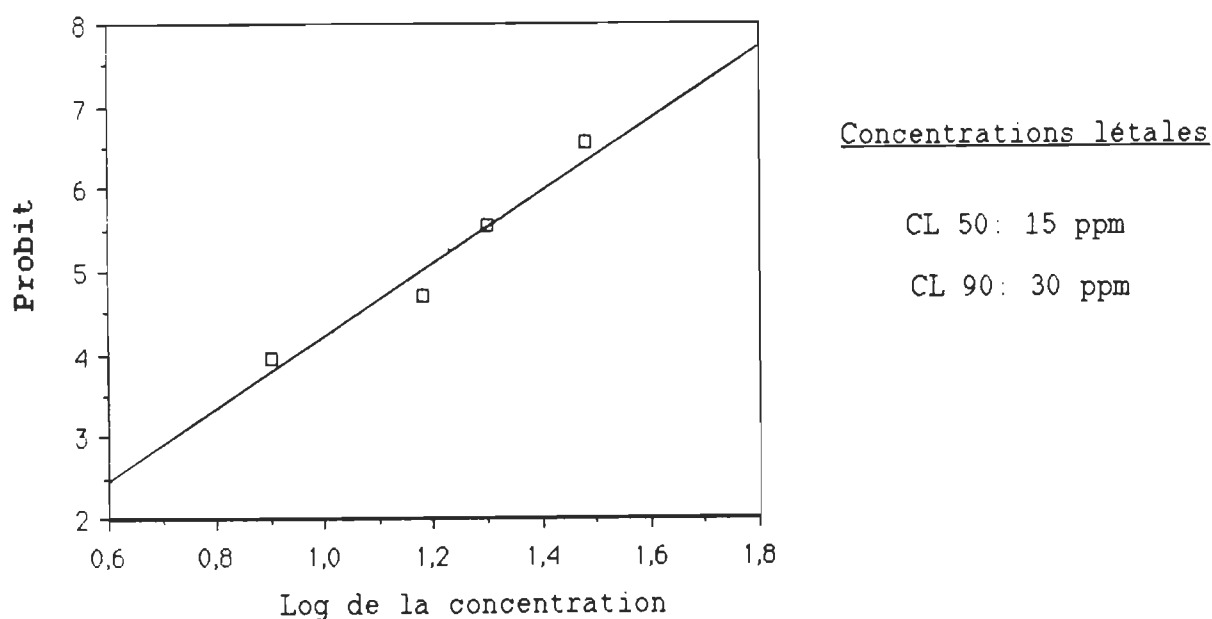


Fig. 15: Valeurs obtenues (\square ; N = 4) avec l'extrait JD264 pour l'expérience #16 après 11 jours de contact.

Si l'on compare les concentrations létales 50 et 90 (fig. 12 et 15) de l'extrait JD 263 et l'extrait JD 264 après 11 jours, ceux-ci sont similaires alors que les pentes sont très proches et semblables.

La figure 16 comprend la compilation des différentes droites probit selon divers temps d'observation ainsi que la diminution des concentrations létales 50 et 90 tout au long du bioessai. On observe le même phénomène qu'avec l'extrait JD 263. Il est donc important que l'observation soit effectuée sur une longue période, c'est-à-dire sur au moins 11 jours.

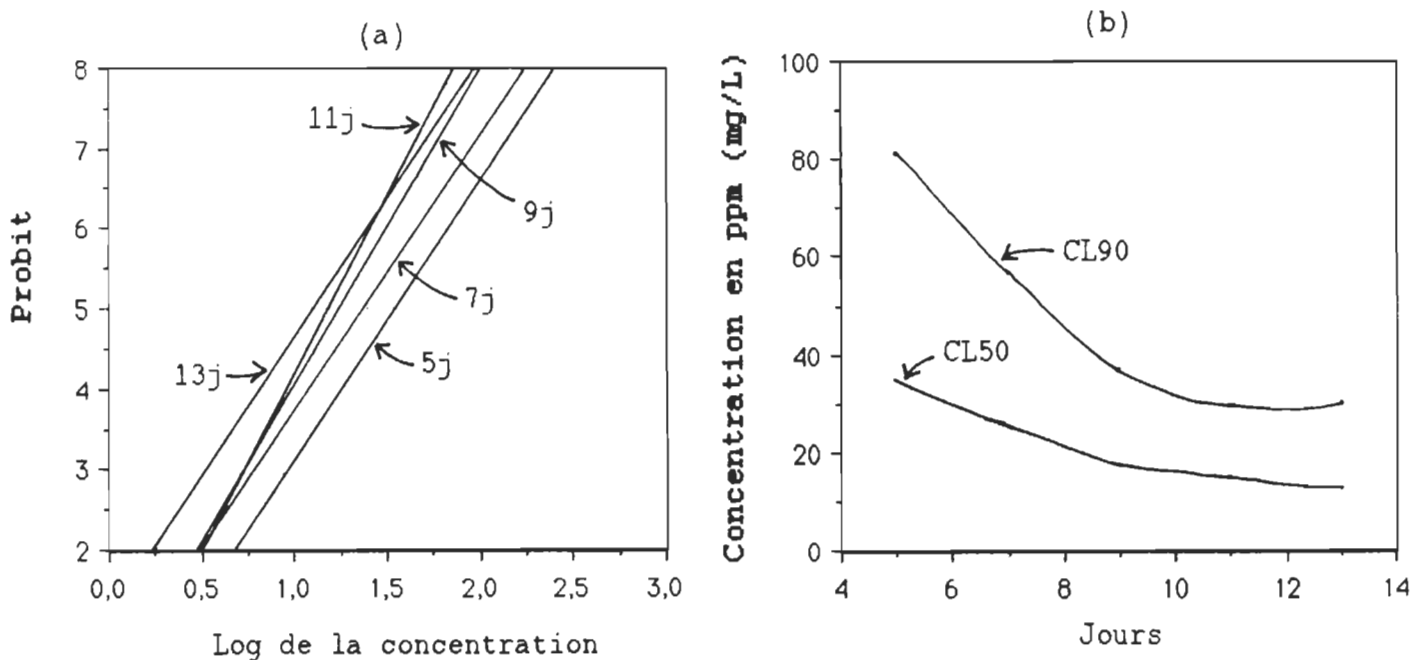


Fig.16: Compilation des droites probit obtenues avec l'extrait JD264 après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #16.

2.2.1.3. Effets sur la croissance

Les larves exposées en permanence à l'extrait brut JD 263 sont de tailles inférieures aux larves témoins (fig. 17). Et cela, même pour celles exposées aux plus faibles concentrations.

Pour vérifier cette observation, une expérience (#17) est réalisée avec des larves témoins et des larves traitées à des concentrations différentes d'extrait JD 264, qui est encore en quantité suffisante pour permettre la réalisation de ce bioessai. Pour bien cerner le phénomène, les mesures sont prises sur les larves témoins et traitées après 4 jours, pour la concentration la plus forte, après 6 jours pour la concentration moyenne et enfin, après 9 jours pour la plus faible concentration (tableau 5).

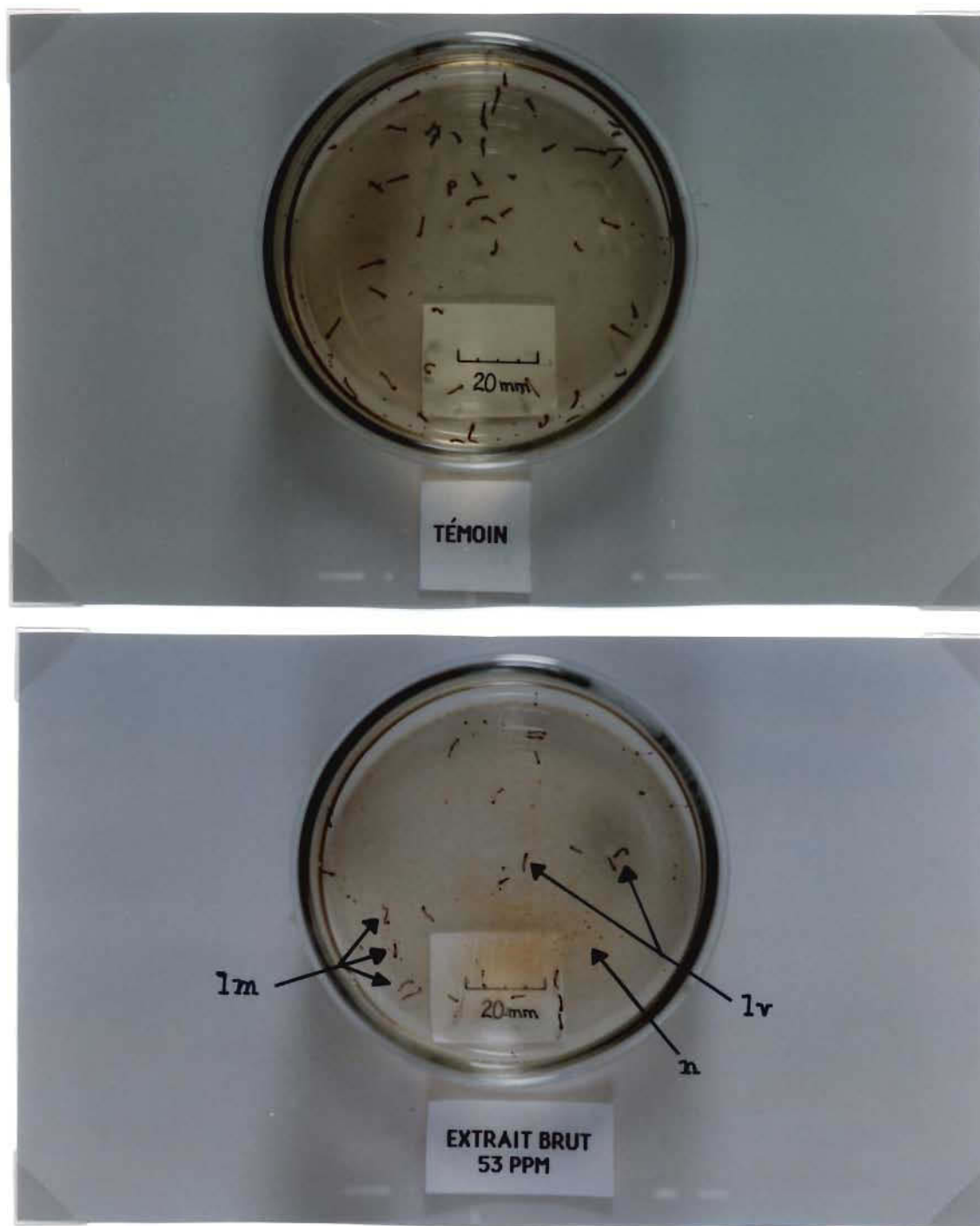


Fig. 17: Effets de l'extrait brut (Lot JD 263) sur des larves de troisième stade d'*Aedes triseriatus*, après 4 jours de contact continu avec le produit, en comparaison à des larves témoins ; n, nourriture (foie déshydraté) ; lm, larves mortes ; lv, larves vivantes. Grossissement - X 1,8.

Tableau 5

Longueurs moyennes des larves témoins et des larves soumises au traitement (3^{ième} stade), ainsi que les mortalités obtenues

Concentrations	Longueurs moyennes des larves en millimètre (nombre de larves mesurées)	Mortalités (en pourcentage)
<u>Après 4 jours</u>		
Témoin	5,89 (90)	0 m/90 (0%)
25 ppm	4,74 (58)	37 m/90 (41%)
<u>Après 6 jours</u>		
Témoin	6,35 (90)	0 m/90 (0%)
Témoin acétone (0.46 mL/L)	6,17 (87)	0 m/90 (0%)
15 ppm	5,27 (66)	28 m/90 (31%)
<u>Après 9 jours</u>		
Témoin	7,36 (56)	2 m/90 (2%)
8 ppm	6,51 (54)	19 m/90 (21%)

Un test de t est nécessaire pour vérifier s'il y a une différence significative entre les longueurs. La valeur obtenue (P:0,000) dans les analyses est la même pour toutes les concentrations comparées à leur témoin. Il est donc évident qu'il y a une différence significative entre la longueur des larves traitées et celles non-traitées.

De plus, le témoin et le témoin acétone de 6 jours sont comparés au témoin acétone afin de s'assurer que l'effet sur la croissance n'est provoqué que par l'extrait brut seulement. L'analyse démontre qu'il n'y a aucune différence significative entre les longueurs de ces deux derniers groupes.

2.2.1.4. Pourcentage d'émergence

Suite aux résultats obtenus précédemment, les expériences #15 (JD263) et #17 (JD264) sont prolongées afin de voir si l'effet sur la croissance peut affecter ou retarder l'émergence.

Les expériences s'échelonnent jusqu'à l'émergence complète ou, la mort des nymphes dans les diverses concentrations (fig. 18 et 19). Cependant, le but premier de l'expérience #17 était d'évaluer l'effet sur la croissance après certains temps d'exposition avec le produit. Ainsi, le pourcentage d'émergence pour cette expérience est réalisé à partir des nymphes qui sont présentes dans le témoin (Nombre de nymphes vivantes: 32) et la concentration 8 ppm (Nombre de nymphes vivantes: 17) restante, puisque les larves de cette expérience ont été sacrifiées pour être mesurées, et qu'aucune nymphe n'était retrouvée dans les autres concentrations.

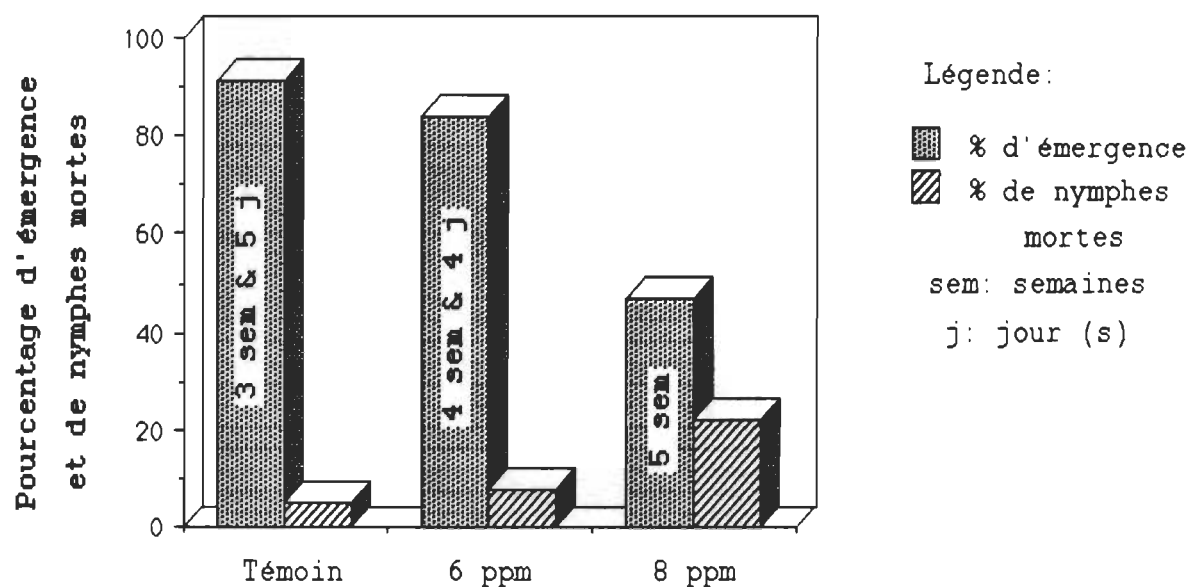


Fig.18: Pourcentage d'émergence et de nymphes mortes chez le témoin et les individus exposés à l'extrait JD263, ainsi que les temps d'émergence, pour l'expérience #15.

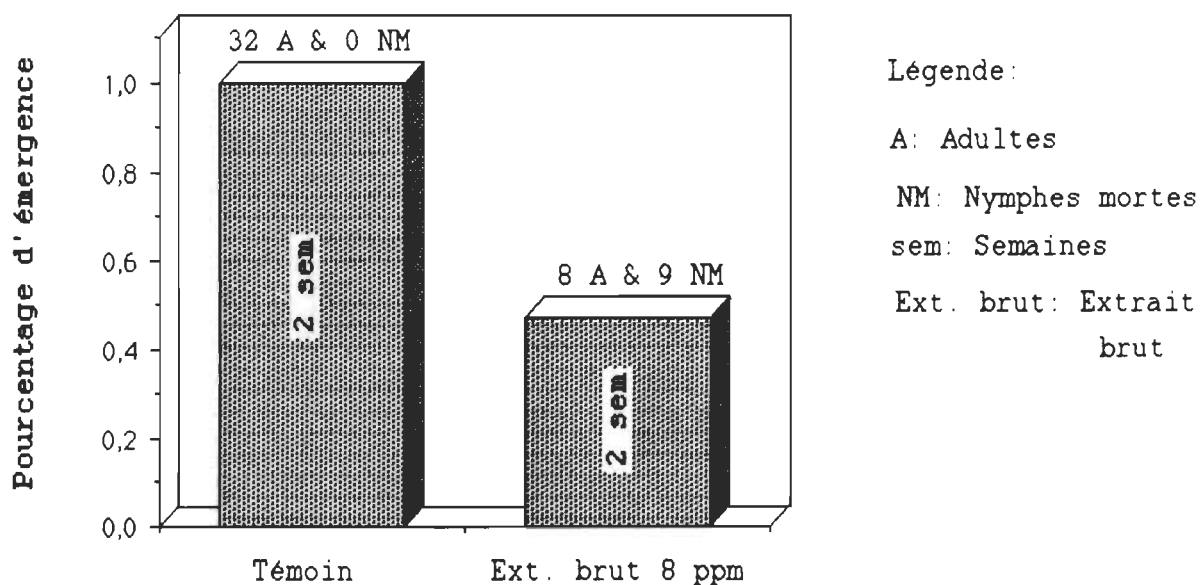


Fig.19: Pourcentage d'émergence chez le témoin et les individus exposés à l'extrait JD264, ainsi que les temps d'émergence, pour l'expérience #17.

Les résultats sont soumis à des tests de χ^2 afin de savoir si les proportions d'adultes dans chaque cas sont significativement différentes l'une de l'autre.

Tout d'abord, examinons les résultats de l'expérience #15. L'analyse indique aucune différence significative ($P:0,15$) entre le témoin et la plus faible concentration (6 ppm). Cependant, le test démontre une différence significative ($P:0,000$) entre le témoin et l'extrait brut à 8 ppm.

Si l'on compare maintenant le témoin et l'extrait brut à 8 ppm de l'expérience #17, l'analyse indique clairement une différence significative ($P:0,99$) entre les deux proportions d'adultes.

Enfin, si on analyse les concentrations de 8 ppm de ces deux expériences (fig. 18 et 19), on constate qu'il n'y a pas de différence significative ($P:0,99$) entre les données obtenues.

2.2.2. Résultats obtenus avec la destruxine E de *Metarhizium anisopliae*

2.2.2.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90

Deux tests préliminaires (#18 et #19) sont d'abord effectués sur des larves de 3^{ème} stade, afin d'évaluer les concentrations requises pour la réalisation des bioessais (tableau 6).

Tableau 6
 Résultats des tests préliminaires avec la destruxine E (DE)
 sur des larves de 3 ième stade

Concentrations	Mortalités selon le temps d'exposition de la DE			
	2 jours	4 jours	7 à 8 jours	12 jours
<u>Expérience #18</u>				
Témoin	3m/225(1%)	10m/225(4%)	17m/225(8%)	28m/225(12%)
11 ppm	7m/135(5%)	44m/135(33%)	87m/135(64%)	108m/135(80%)
22 ppm	2m/124(2%)	29m/124(23%)	99m/124(80%)	122m/124(98%)
<u>Expérience #19</u>				
Témoin	3m/96(3%)	3m/96(3%)	3m/96(3%)	5m/95(5%)
14 ppm	4m/100(4%)	45m/100(45%)	86/100(86%)	97m/100(97%)

Tout comme avec les extraits bruts, très peu de mortalités sont dénombrées durant les 4 premiers jours. Selon les concentrations, 50% de mortalité est observé dans un intervalle de 4 à 8 jours d'exposition avec la destruxine. Au-delà de 9 jours, la mortalité atteint 90% pour 14 ppm et 22 ppm, alors que pour 11 ppm, ce pourcentage est atteint 20 jours après le début du traitement.

Suite à ces résultats, un troisième traitement (#20) est entrepris, mais cette fois-ci avec des larves de premier stade. La

raison de ce choix est leur plus grande sensibilité ce qui permet de réduire la quantité de produit à utiliser (fig. 20).

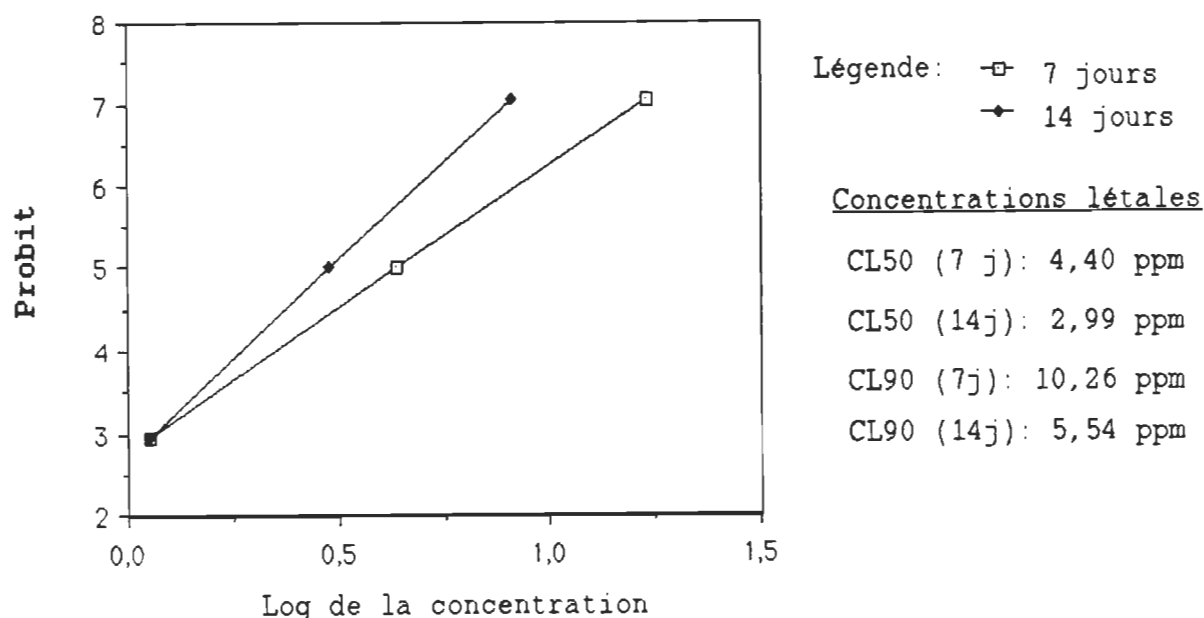


Fig.20: Résultats de l'expérience #20 après 7 jours et 14 jours de contact avec la destruxine E.

L'exposition continue de la destruxine E sur les larves de moustiques démontre la même tendance qu'avec les extraits bruts. Les concentrations létales 50 et 90 diminuent lorsque le temps d'exposition augmente.

Tout comme avec les extraits bruts, les droites probit obtenues à différents temps d'observation ainsi que les concentrations létales 50 et 90 sont exposées dans la figure 21, afin de voir l'évolution dans le temps de la destruxine E sur des larves de 1^{er} stade.

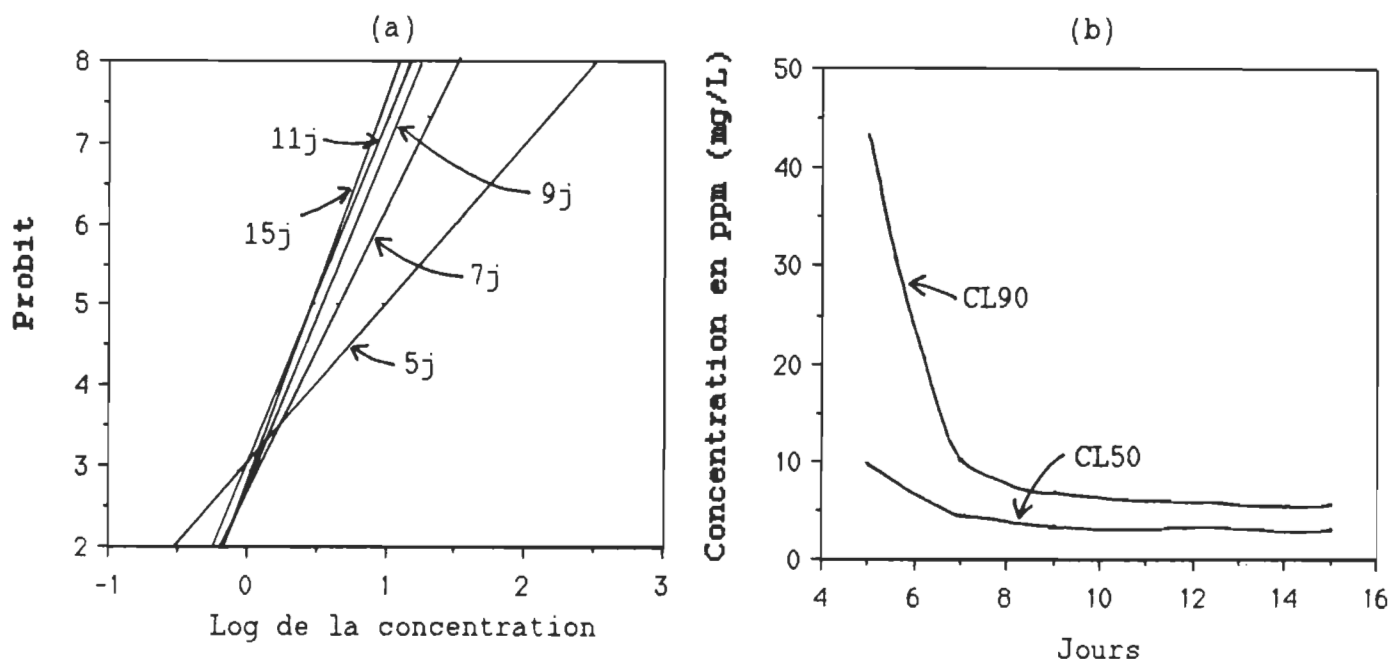


Fig. 21: Compilation des droites probit obtenues avec la destruxine E sur des larves de 1^{er} stade après différents temps d'observation (a) ainsi que les CL50 et CL90 (b) pour l'expérience #20.

Bien que le stade larvaire est différent de celui des expériences #14, #15 et #16 avec les extraits bruts (fig.13, 14 et 16), on constate une tendance similaire dans l'action de la destruxine E par rapport aux extraits bruts, c'est-à-dire un effet à retardement sur la mortalité des larves pendant les premiers jours du traitement ainsi qu'une stabilisation de la mortalité après un certain temps d'exposition soit environ 11 jours.

2.2.2.2. Effets sur la croissance

Quelques tests préliminaires réalisés sur des larves néonates (1 heure après l'éclosion) démontrent un certain effet sur la taille des spécimens exposés à la destruxine E. Un test plus approfondit (#21) est nécessaire afin d'évaluer l'importance de ce phénomène.

Deux éléments sont soigneusement contrôlés par rapport aux tests préliminaires. Tout d'abord, l'acétone, qui peut être la ou l'une des causes de cette diminution de taille et enfin, la répartition égale de nourriture dans chaque puit.

Seules les larves de la plaquette A sont utilisées dans les analyses (tableau 7).

Tableau 7

Résultats obtenus chez les témoins et les larves exposées à la destruxine E après 96 heures de contact, pour la plaquette A

Conditions expérimentales	Longueurs moyennes des larves en millimètre	Stade larvaire	
		1 ^{ier}	2 ^{ième}
Témoin	2,37	2	18
Témoin acétone	2,12	7	14
Destruxine E 15 ppm	1,49	24	0

Dans les deux autres plaquettes (B et C), la mortalité des larves est trop forte après 48 heures d'observation pour constituer un résultat intéressant. Cela est probablement provoqué par le manque de nourriture dans ces plaquettes.

C'est à l'aide du test de t que les longueurs moyennes sont analysées (tableau 7).

Les deux témoins sont soumis à l'analyse qui confirme qu'il y a une différence significative ($P:0,003$) entre les deux longueurs moyennes. L'acétone peut donc affecter la croissance des larves.

Par la suite, le témoin acétone est comparé à la destruxine E. Encore une fois, l'analyse indique qu'il existe une différence significative ($P:0,000$) entre les deux longueurs moyennes. La toxine accentue de façon évidente la différence de taille par rapport aux larves témoins.

Les stades larvaires sont comparés à l'aide du test de χ^2 .

Les témoins sont soumis à l'analyse. Celle-ci démontre qu'il n'y avait pas de différence significative ($P:0,07$) entre la proportion de larve de 1^{er} stade et la proportion de larves de 2^{ième} stade.

Si on compare maintenant les témoins et les larves traitées, l'analyse indique une différence significative ($P:0,000$) entre ces deux groupes.

Contrairement à ce qui est observé sur des larves de 3^{ième} stade (expérience #17), l'acétone semble exercer un certain effet sur la croissance. Cependant, il reste évident que la destruxine E affecte la croissance des larves néonates.

2.2.2.3. Pourcentage d'émergence

La destruxine E provoque une mortalité chez les larves de moustiques de 1^{er} stade larvaire (#20) et de 3^{ième} stade (#18 et #19), ainsi qu'un retard de croissance (#21). Les larves qui ne sont pas mortes (#20) suite à l'exposition continue du produit ont subi une nymphose. Il reste à savoir si celles-ci peuvent émerger. Comme on l'a déjà mentionné précédemment, l'expérience #20 est réalisée avec des larves de 1^{er} stade (fig. 22).

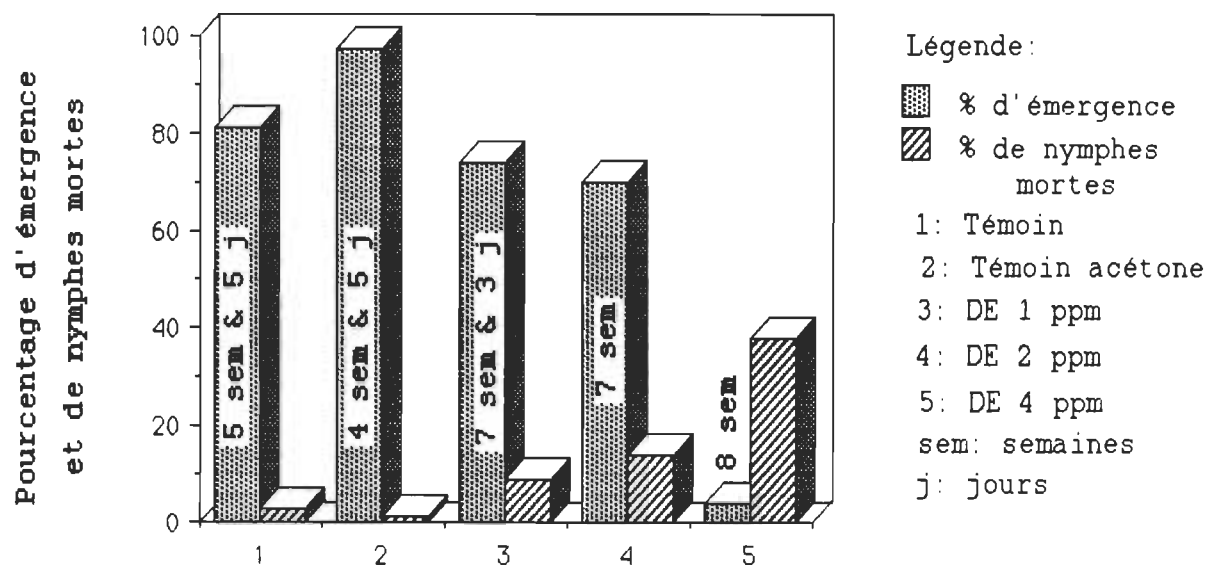


Fig.22: Pourcentage d'émergence chez les témoins et les individus exposés à la destruxine E, ainsi que les temps d'émergence.

Les données obtenues sont traitées par une analyse de χ^2 . Les deux témoins sont comparés l'un à l'autre. L'analyse indique une différence significative entre les témoins ($P:0,006$). Le témoin acétone présente un % d'émergence plus élevé que le témoin. Afin de vérifier si cette réponse est la même, une expérience n'impliquant que le témoin et le témoin acétone est répétée dans les mêmes conditions. La réponse obtenue est différente puisque le test indique qu'il n'existe pas de différence significative ($P:0,56$). Après 4 semaines et 2 jours, le témoin comporte 85% d'émergence alors que le témoin acétone en comprend 83%.

Lorsqu'on compare le témoin et la destruxine 1 ppm ($P:0,22$) ou la destruxine 2 ppm ($P:0,063$) à l'aide du test, on dénote aucune

différence significative entre ces % d'émergence. Cependant, lorsqu'il s'agit du témoin acétone, l'analyse indique une différence ($P:0,000$) entre celui-ci et les deux concentrations.

On remarque également que le pourcentage de mortalité chez les nymphes a tendance à augmenter pour les concentrations les plus fortes.

2.2.2.4. Persistance

Le retard de croissance ainsi que les mortalités chez les nymphes sont des éléments intéressants pour un insecticide. La persistance du produit pendant un certain laps de temps peut être un autre point positif.

Nous avons donc entrepris une première évaluation quant à la persistance de la destruxine E en regroupant les données recueillies dans une expérience antérieure (#19) et en effectuant une série de bioessais. Ces expériences (#19, #22, #23, #24, #25) sont réalisées avec le restant d'une solution mère réfrigérée à 4°C depuis un certain temps, avec des solutions fraîches, et en réutilisant des préparations qui ont déjà servi dans des expériences antérieures.

Tableau 8

Résultats obtenus après 6 jours chez les témoins et les individus soumis au traitement, à une température de 21°C

Solutions	Mortalités après 6 jours			# Exp.
	Témoin* ou Témoin acétone*	Destruxine E 7 ou 8 ppm	Destruxine E 14 ppm	
Solution	4 m/100	-----	82 m/100	#19
fraîche			78 m/ 90	#22
Solution de	0 m/ 91	72 m/ 90	79 m/ 91	#22
15j réfrigérée		(7 ppm)		
à 4°C				
Solution de 7				
sem & 6 j dans	2 m/135	2 m/136	-----	#25
des pots à 21°C		(8 ppm)		
avec des larves				
Solution de 10				
sem & 5 j	0 m/ 45	5 m/ 90	34 m/ 85	#23
réfrigérée à 4°C		(7 ppm)		
Solution de 15				
sem & 5 j	0 m/ 45	4 m/ 90	6 m/ 90	#24
(10 sem & 5 j:		(7 ppm)		
réfrigérée à 4°C				
puis 5 sem & 5 j:				
21°C avec larves)				

* Le tableau ne renferme que la mortalité la plus élevée, qui a été obtenue dans le témoin ou le témoin acétone.

Ces données sont traitées par une analyse de χ^2 pour vérifier s'il existe une différence significative entre elles.

Comparons d'abord les valeurs des expériences #22 et #23 pour une concentration de 7 ppm. Le test indique qu'il y a une différence significative ($P:0,000$) entre ces deux expériences donc que pour une même concentration, l'effet diminue après un certain temps.

Analysons maintenant s'il en est de même pour une concentration plus forte (14 ppm). Tout d'abord, les données des solutions fraîches (#19 et #22) et celles de la solution de 15 jours (#22) sont analysées. L'analyse démontre que les proportions retrouvées dans les trois expériences sont similaires ($P:0,57$). Ainsi, la solution préparée depuis 15 jours et entreposée à 4°C ne semble pas avoir perdu ses propriétés.

Comparons à présent les données précédentes avec le résultat de l'expérience #23 pour 14 ppm. Bien que précédemment, les proportions sont considérées comme similaires, le test indique maintenant une différence significative ($P:0,000$) lorsque la proportion de l'expérience #23 est comparée aux trois autres. On peut supposer que la destruxine E de 10 semaines et 5 jours a perdu de son efficacité. Il y a donc une dégradation de la toxine à 4°C, dans un milieu aqueux.

Il en est de même pour l'expérience #24. La forte diminution de la toxicité à 14 ppm par rapport à l'expérience #23 peut être liée à plusieurs facteurs. La solution utilisée était plus vieille, la température est plus élevée (21°C) pendant plus de 5 semaines et 5 jours après avoir été réfrigérée à 4°C (10 semaines et 5 jours), et enfin, la solution est exposée à des larves pour la seconde fois.

L'expérience #25 démontre que la dégradation de la destruxine E est plus rapide à une température de 21°C qu'à 4°C.

3. DISCUSSION

3.1. Larves de simuliés

3.1.1. Détermination des concentrations létales 50 et 90 avec les extraits bruts de *Metarhizium anisopliae*

3.1.1.1. Résultats obtenus en laboratoire

Deux éléments importants sont considérés dans cette partie. Premièrement, savoir si nous pouvons obtenir des mortalités après 24 heures de contact avec l'extrait brut (JD 263) et quelles sont les concentrations létales 50 et 90.

Deuxièmement, savoir s'il est possible de diminuer le temps de contact à 1 heure seulement et déterminer les concentrations nécessaires pour obtenir des mortalités de 50 et 90 %.

Dans les deux cas, nous obtenons des mortalités. Les concentrations requises pour provoquer 50 ou 90 % de mortalité, pour 1 heure ou 24 heures de contact, sont relativement similaires d'après les tests statistiques de comparaison. Il est donc possible de diminuer le temps de contact à 1 heure. Il en est de même pour

les différents temps de lecture des mortalités. Ainsi, les données recueillies lors d'une lecture faite après 24 heures sont pratiquement les mêmes après 48 heures (fig. 7, p.45).

Les différents éléments (espèces, température de traitement, densité, etc.) constituant chaque expérience peuvent avoir influencés quelque peu les données obtenues. De plus, il aurait été intéressant de comparer le parallélisme des droites et les concentrations létales 50 et 90 non transformées en logarithmes. Les données récoltées se seraient peut être avérées significativement différentes. Cependant, les expériences réalisées sur le terrain révèlent qu'effectivement un temps de lecture de 24 heures est suffisant pour la récolte des données et qu'un temps de contact d'une heure est suffisamment long pour obtenir les mortalités désirées.

Puisque les concentrations létales 50 ou 90 sont pratiquement identiques dans les expériences réalisées en laboratoire, on est porté à croire que les larves ingurgitent une certaine quantité de produit, puis qu'elles cessent de s'alimenter jusqu'à ce qu'elles meurent d'intoxication.

Un effet phagodépresseur avec les destruxines A et B a déjà été observé chez des larves d'*Epilachna sparsa* Hbst. (Coccinellidae) par Kodaira (1961), alors que Roberts (Observations non publiées, cité par Roberts, 1981) remarquait le même phénomène chez des adultes de *Carausius morosus* Brunn. (Phasmidae).

Cependant, ils leur étaient difficiles de savoir si la mort avait été provoquée par la privation de nourriture ou par l'ingestion de toxines (Roberts, 1981).

Dans notre cas, les expériences #1, #2, #3 et #4 sont réalisées sans qu'aucune nourriture soit introduite lors du traitement jusqu'aux temps de lectures (24 et 48 heures). Bien que des mortalités sont dénombrées dans les témoins, on constate une différence significative entre la mortalité des témoins et celles obtenues lors du traitement avec le produit. Cette mortalité est donc provoquée par un autre facteur que la privation de nourriture. Cet aspect sera traité à nouveau lors de la discussion des résultats obtenus sur moustiques.

Bien que la destruxine A (11%) et la destruxine B (6,2%) constituent une part moins importantes dans les extraits bruts que la destruxine E (22%), il n'en demeure pas moins que leur proportion reste plus élevée comparativement aux 11 autres destruxines présentes dans ce composé (Fargues et Robert, 1986).

Des études réalisées sur des diptères (*Culex pipiens*, *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica*) ainsi que chez un lépidoptère (*Galleria mellonella*) démontrent que l'intoxication varie suivant la nature chimique du composé testé (Fargues *et al.*, 1986; Vey *et al.*, 1987; Vey et Quiot, 1989). On dénote une activité maximum chez le composé porteur d'un cycle époxyde (destruxine E), très réactif et pouvant servir de site de fixation. Les cibles

atteintes par la destruxine E, de manière la plus évidente chez les diptères (*Drosophila melanogaster*; *Musca domestica*; *Culex pipiens*), sont le mésenteron et le tissu adipeux. Au niveau du mésenteron, les lésions consistent en des modifications des mitochondries et du reticulum endoplasmique. Les noyaux des cellules acquièrent un aspect différent, alors que des changements importants apparaissent dans le cytoplasme. Le tissu adipeux, lui, présente également des noyaux altérés, qui sont plus arrondis et qui montrent des modifications à caractère pycnotique (Vey *et al.*, 1987; Vey et Quiot, 1989).

Cependant, Vey *et al.* (1987) mentionnent que même si l'action de la destruxine E présente des traits communs avec celle de certaines toxines bactériennes telle que la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* malgré une grande différence dans la nature chimique des molécules, elle s'en distingue par le fait qu'elle ne conduit pas jusqu'à la lyse des cellules.

La destruxine A démontre une efficacité presque équivalente à la destruxine E chez le lépidoptère *Galleria mellonella*. L'activité toxique de celle-ci pourrait être liée, une fois introduite dans l'hôte, à l'époxydation de sa double liaison (Fargues *et al.*, 1986; Vey et Quiot, 1989). Cependant, son efficacité est plus réduite chez les diptères et les concentrations létales 50 et 90 se rapprochent parfois de celles de la destruxine B. C'est chez le moustique *Culex pipiens* que les différences entre les

concentrations létales des destruxines E et A sont les moins prononcées (Fargues et Robert, 1986).

3.1.1.2. Résultats obtenus sur le terrain avec les extraits bruts

Trois étapes sont établies lors des traitements sur le terrain avec les extraits de *M. anisopliae*. La première est de vérifier la réponse des larves vis-à-vis les extraits, dans des conditions différentes à celles du laboratoire. La seconde est d'évaluer les concentrations nécessaires pour avoir 50 et 90 % de mortalité. Enfin, la dernière est de déterminer si le temps de lecture optimal des mortalités est similaire à celui obtenu antérieurement en laboratoire, soit 24 heures.

Les larves répondent différemment aux traitements et selon le lot utilisé. Il semblerait que lors de la préparation du lot JD 264, une variante ait été introduite dans la méthodologie de préparation de l'extrait. Il s'agirait d'une filtration effectuée à un certain moment afin d'obtenir un produit plus "propre". Cette opération a enlevé les particules présentes dans l'extrait, principalement des fragments provenant des parois d'hyphes et de blastoconidies du champignon ou encore des débris cellulaires.

La présence de débris (parois d'hyphes et de blastoconidies, organites cellulaires) semble être une cause des résultats obtenus. La première préparation testée (JD 261) est le plus vieux lot parmi

les trois. C'est avec ce lot que l'on obtient une quantité importante de particules floconeuses dans la solution mère. Lors du traitement, il est alors facile pour les larves de capturer ces particules pour s'en alimenter. Une certaine quantité de toxines peut y être adhérente et ainsi être ingérée. Une autre possibilité est que les toxines sont présentes dans les débris cellulaires (vacuoles, mitochondries, etc.) du champignon et qu'une fois à l'intérieur de l'insecte elles sont libérées lors de la digestion.

L'on remarque également que les mortalités obtenues avec les deux plus fortes concentrations sont relativement similaire (Expérience #8: 2,46 ppm: 70% ; 3,93 ppm: 68%). Des études ont démontré que le taux d'ingestion chez les larves de simules augmentait de façon asymptotique avec la concentration de particules (Hart et Latta, 1986; Morin *et al.*, 1988; Ciborowski et Craig, 1989). On peut donc présumer que le taux optimum d'ingestion est atteint lors de notre traitement, avec la concentration de 2,46 ppm.

Il n'en est pas de même avec le lot JD 264 (Expérience #10), puisque la solution mère ne contient pratiquement pas de particules, et aucune mortalité n'est dénombrée.

Le lot JD 263 contient des particules floconneuses (Expérience #9) mais en quantité moins importante que le lot JD 261, ce qui peut expliquer l'absence de mortalité chez les larves de mouches noires.

Cependant, d'autres traitements similaires devront être fait afin de s'assurer que c'est bien la méthode d'extraction qui peut influencer cette variabilité entre les différents résultats.

Enfin, la préparation JD 264 précipitée avec le Na_2HPO_4 et le CaCl_2 n'améliore pas le traitement (Expérience #11). L'inefficacité de cette démarche démontre que les toxines restent en solution malgré cette précipitation au calcium et qu'elles ne peuvent être saisies par les plumeaux céphaliques des larves de simulies. De plus, un bioessai en laboratoire sur larves de moustiques (*Aedes triseriatus*, 3^{ième} stade) démontre qu'il n'existe aucune différence significative dans les mortalités obtenues avec l'extrait et le surnageant (portion liquide après la précipitation avec le Na_2HPO_4 et le CaCl_2). La présence des toxines dans ce lot est mise en évidence dans ce même bioessai puisqu'on peut observer un potentiel toxique équivalent sur moustiques à l'autre lot utilisé en laboratoire (JD 263).

La seconde étape, qui est d'évaluer les concentrations nécessaires pour obtenir 50 et 90% de mortalité, est réussie dans l'expérience #8. Les concentrations à déverser dans le système de dalles sont relativement faibles par rapport au laboratoire. On peut observer le même phénomène avec le Teknar HP-D[®]. Cependant, il existe quelques différences qui sont encore difficiles à expliquer, puisque les données recueillies lors des traitements en dalles sont relativement restreintes.

La concentration létale d'extrait brut (JD 261) requise pour tuer 50% des larves est 82 fois inférieure (1,0 ppm) à celle (JD 263) nécessaire en laboratoire (82 ppm). La concentration létale 90, elle, est 55 fois moins importante (7,53 ppm) qu'en laboratoire (413 ppm). L'inclinaison des pentes n'est pas similaire dans les deux cas, ce qui explique les différences entre les proportions. La pente obtenue en laboratoire (fig. 8, p.46) est plus forte que celle obtenue sur le terrain (fig. 9, p.47).

La différence entre les deux pentes peut être causée par la différence dans les lots. D'après les données obtenues avec les concentrations les plus fortes, la présence d'un grand nombre de particules lors du traitement en dalle semble influencer le comportement des larves. La quantité trop importante de flocons peut provoquer l'arrêt de l'alimentation lors du traitement (Ciborowski et Craig, 1989).

Pour le Teknar[®], les proportions sont les suivantes, une concentration létale 50 sur le terrain qui est 49 fois inférieure (0,0073 ppm) par rapport à la valeur en laboratoire (0,36 ppm), alors que la concentration létale 90 est 164 fois inférieure (0,0136 ppm) à celle du laboratoire (2,23 ppm). On observe ici le phénomène inverse comparativement à l'extrait brut, puisque la pente en laboratoire est plus faible que celle du terrain. Encore une fois, cette différence par rapport à l'extrait peut s'expliquer par la forme sous laquelle les produits sont présentés aux larves.

Tout comme le Teknar[®] et les traitements en laboratoire, l'évaluation des mortalités peut être exécutée 24 heures après le traitement en dalle. Il n'est pas nécessaire d'attendre une période de 72 heures. De plus, nous observons dans les dalles traitées avec les plus fortes concentrations des mortalités seulement 1 heure après la mise du produit (JD 261). En général, les larves mortes restent accrochées dans la dalle, le corps raide et en forme de "S", tout en ayant les plumeaux céphaliques déployés. L'effet toxique observé ici est très rapide si l'on compare avec les résultats obtenus chez d'autres insectes (Diptère: *Aedes albopictus* et Lépidoptère: *Galleria mellonella*) exposés à la destruxine E. Vey et Quiot (1989) mentionnent que des signes de pycnose sont visibles dans les cellules de l'épithélium mésentéral 7 heures après le début de l'expérience chez *G. mellonella* exposés à la destruxine E. Chez *A. albopictus* les mortalités provoquées par la destruxine E commencent après 1 à 2 jours (Ravallec *et al.*, 1989).

3.1.1.3. Traitement avec le Teknar HP-D[®] et l'extrait brut JD 261 sur le terrain

Les résultats obtenus dans l'expérience #12 ne sont pas ceux que l'on prévoyait avec le Teknar HP-D[®]. La concentration qui est appliquée dans le traitement A (tableau 4, p.49) est calculée d'après les prétests réalisés le 23 et 24 mai 1990 avec le Teknar HP-D[®], sur le terrain. Pour une concentration de $0,0065 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Teknar[®] la mortalité attendue est d'au moins 50 % (tableau 1, p.26) alors que celle obtenue est de 13 % (tableau 4, p.49).

Les larves utilisées proviennent du même endroit et les espèces sont les mêmes (espèces polyvoltines). Cependant, les températures de traitement dans les prétests sont entre 10 et 13°C alors qu'elle est de 17°C dans l'expérience #12.

Normalement, une augmentation de température devrait entraîner un accroissement du métabolisme chez les larves, et ainsi intensifier l'efficacité du produit pour une même concentration. Cependant, la température optimale varie d'une espèce à l'autre et lorsque les seuils sont dépassés, l'animal réagit négativement et peut modifier son comportement habituel (Back et Harper, 1979; Colbo et Porter, 1980). Peterson et Wolfe (1958) considèrent que des températures de 7 à 13°C sont optimales chez les espèces polyvoltines et que des températures supérieures à 15°C sont défavorables.

Une autre explication peut venir s'ajoutée à la précédente. Le stade larvaire est plus avancé dans le dernier bioessai (expérience #12) comparativement aux prétests. Une plus grande sensibilité des stades plus jeunes envers le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a déjà été mise en évidence dans divers travaux de recherches (Guillet et Escaffre, 1979; Molloy *et al.*, 1981).

Enfin, les conditions de terrain (l'heure du traitement, les variations de la température de l'eau, la présence importante de particules en suspension, etc.) peuvent jouer un rôle important dans les résultats récoltés. Il serait intéressant de répéter des

traitements similaires mais en laboratoire, afin de mieux contrôler les conditions expérimentales, avec les extraits bruts ainsi qu'avec la destruxine E, qui a déjà fait l'objet de test préliminaire avec le Teknar HP-D[®] (Lepage *et al.*, 1991).

3.2. Larves de moustiques

Les données recueillies dans cette section ne peuvent pas être comparées directement avec les résultats sur simuliés. L'objectif est de vérifier le pouvoir toxique des extraits bruts et de la destruxine E, chez un diptère (*Aedes triseriatus*) adapté à des conditions environnementales différentes. Ce qui permet par la suite de mieux saisir le mode d'action des produits chez certains diptères piqueurs.

3.2.1. Résultats obtenus avec les extraits bruts (JD 261, JD 263 et JD 264) sur des larves néonates

Bien que le même type de bioessai ait été réalisé avec le *B.t.i.* et que des résultats stables ont pu être recueilli (Tousignant *et al.*, accepté), il n'en ait pas de même avec les extraits bruts.

L'hétérogénéité dans les données récoltées avec chaque extrait démontre la difficulté d'obtenir une mortalité stable à court terme. Ce test ne semble donc pas approprié à première vue pour déterminer les concentrations létales 50 et 90 avec les

différents lots d'extraits bruts. Il ne doit cependant pas être mis de côté pour de futurs bioessais.

Malgré l'hétérogénéité entre les données, les droites probit sont relativement proches. Les concentrations létales 50 sont elles aussi peu éloignées les unes des autres (fig.10, p.52). La même observation est apportée concernant les larves de 3ième stade traitées avec les lots JD 263 et JD 264 après un certain temps d'exposition (fig.12, p.55 et fig.15, p.57).

Il serait intéressant d'entreprendre une autre série de bioessais mais cette fois-ci, avec les destruxines pures afin de pouvoir émettre une comparaison entre les résultats déjà obtenus avec les extraits et ceux obtenus avec les destruxines.

3.2.2. Résultats obtenus avec les extraits bruts (JD 263 et JD 264) sur des larves de 3ième stade

Contrairement aux simuliés, les larves de moustiques présentent des mortalités après 3 ou 4 jours d'exposition continue avec les extraits. Très peu de mortalités sont apparentes avant ce délai, même pour les plus fortes concentrations. Cependant, lorsque le processus est amorcé, les taux de mortalités augmentent très rapidement. Après 11 jours d'observation pour les lots JD 263 et JD 264, les concentrations létales 50 et 90 sont relativement similaires ainsi que la pente des droites probit.

Là encore, le phénomène de phagodépression peut jouer un rôle dans nos observations. Tout comme les larves de simuliés, les moustiques, après avoir ingurgités une petite quantité d'extrait peuvent cesser de s'alimenter soit parce que leur métabolisme est affecté par les effets des toxines (Ravallec *et al.*, 1989; Vey et Quiot, 1989) soit par refus d'ingurgiter d'avantage de produit.

On peut se demander alors pourquoi la mortalité est si longue à venir puisque chez les simuliés la mort survient dans les 24 heures après l'ingestion du produit. Une mortalité tardive était aussi observée chez d'autres espèces de moustique (*Aedes albopictus*; *Culex pipiens*) traitées avec la destruxine E (Vey *et al.*, 1987; Ravallec *et al.*, 1989).

Il est possible que les larves soient affectées par les effets toxiques, mais que le jeûne prolongé provoque la mort. Cependant, il est important de noter que la nourriture mise lors du traitement est toujours présente dans les pots traités après 15 jours d'observation. En contraste, les larves témoins requièrent constamment de la nourriture puisque l'eau dans laquelle elles baignent, est claire et sans particules (foie) (fig. 17, p.60). Si la mortalité retrouvée dans les pots traités est causée par le jeûne, cette mortalité serait alors relativement identique dans l'ensemble des pots traités. Ce qui n'est pas le cas dans nos résultats.

Une autre hypothèse est que les larves, pendant les premiers jours, ingère de la nourriture de même que les extraits, mais en très petite quantité puisqu'il est possible que celles-ci détectent la substance indésirable. Par la suite (3 à 4 jours) les premières mortalités causées par les effets toxiques feraient leur apparition.

Les larves qui survivent au traitement sont de tailles inférieures aux larves témoins. De même, l'émergence chez les individus exposés aux extraits JD 263 et JD 264 (#15 et #17) est plus difficile que dans les témoins, puisqu'un certain pourcentage de mortalité est retrouvé dans les pots contenant l'extrait. Cette mortalité chez les nymphes est proportionnelle à la concentration présente dans chaque pot. De plus, la transformation des larves en nymphes ainsi que la période d'émergence s'étendaient sur une plus longue période.

Toutes ces observations démontrent d'une façon évidente que le métabolisme des larves est affecté par les extraits, soit physiologiquement (ex: actions sur le tissu épithélial du mésenteron ou du tissu adipeux), ce qui peut entraîner un effet phagodépresseur, soit en provoquant un arrêt volontaire des larves à s'alimenter adéquatement suite à la détection du produit dans leur environnement. Tout ceci provoque par la suite des conséquences néfastes dans le développement normal des spécimens.

Il est important de se rappeler que le décompte de la mortalité doit s'effectuer après une période d'exposition relativement longue avec les extraits bruts soit environ 11 jours, puisque la mortalité est de beaucoup supérieure après ce laps de temps à celle observée pendant les premiers jours du traitement (fig. 13, 14, p.56 et 16, p.58) et qu'elle se stabilise après ce temps. Cette observation concerne les deux lots testés puisqu'ils agissent de la même façon.

Pour l'instant, il est difficile d'évaluer qu'elle est la concentration minimale à utiliser pour avoir un pourcentage déterminé de mortalité après 11 jours d'exposition avec les produits. Ceci peut s'expliquer de la façon suivante: bien que les extraits semblent avoir une certaine persistance, des tests préliminaires ont démontrés une dégradation de 50% de la concentration initiale (Lot JD 264) après 17 jours, à une température de 21°C, dans des conditions de laboratoire similaires aux conditions expérimentales retrouvées dans ce mémoire (Dumas, 1991).

3.2.3. Résultats obtenus avec la destruxine E de *Metarhizium anisopliae*

Les bioessais réalisés avec la destruxine E ont pour but de faciliter la compréhension du mode d'action des extraits bruts. Il est difficile d'évaluer les effets qu'un composé peut exercer sur un organisme vivant. Il faut se rappeler que chaque extrait brut

contient 14 destruxines différentes, sans compter les autres métabolites ou substances présentes dans chaque préparation.

Si l'effet létal des extraits est provoqué seulement par la destruxine E , on peut s'attendre à ce que la concentration d'extraits à employer soit proportionnelle au pourcentage de destruxine E présente dans ce composé (22%). Cependant, la concentration devra être plus forte si les larves sont du 3 ième stade, puisque les larves de 1 ier stade sont en général plus sensibles que les larves de 3 ième stade.

Si par contre l'effet létal des extraits est attribué à la destruxine E mais également à d'autres substances présentes dans ce composé, la CL 50 sera plus faible puisque ces autres substances augmentent la toxicité des produits.

Il est difficile d'évaluer laquelle des deux propositions précédentes correspond à la réalité. Les résultats obtenus avec la destruxine E démontre plusieurs similitudes avec les extraits bruts. Le même phénomène est observé avec la destruxine E et les extraits JD 263 et JD 264 par rapport à la stabilisation des mortalités après un certain temps (environ 11 jours) ainsi que le déplacement des droites probit. Il est important de se rappeler que la destruxine E est la substance principale retrouvée dans les extraits, et qu'elle est la plus toxique vis-à-vis les diptères. Cependant, les destruxines A et B ne sont pas inertes lorsqu'elles sont mises en présence de diptères (Fargues et Robert, 1986). Il

serait fort possible que ces substances augmentent le potentiel toxique des extraits, bien que la destruxine E demeurerait l'élément toxique principal.

D'autres expériences seront nécessaires pour mieux définir si cette hypothèse est exacte. Il serait intéressant de réaliser ces bioessais avec des larves de même stade avec la destruxine E et les extraits bruts, ce qui faciliterait la compréhension des résultats. S'il existe effectivement une action combinée de la destruxine E et des autres substances, l'utilisation éventuelle des extraits bruts lors d'un contrôle sur des larves de moustiques sera plus avantageuse, puisque la quantité de produit à utiliser serait moins importante.

Les effets sur la croissances ainsi que sur l'émergence sont également similaires aux données obtenues avec les extraits bruts. C'est-à-dire, la taille inférieure chez les larves exposées à la destruxine E, ainsi qu'un retard dans l'émergence ou une mortalité plus forte chez les nymphes. Ceci démontre le lien entre la destruxine E et les extraits bruts.

En ce qui concerne la persistance de la destruxine E, celle-ci semble persister relativement longtemps dans un milieu aqueux. Cependant la persistance semble être influencée par la température. En effet, à une température de 4°C l'action toxique de la destruxine E persiste plus longtemps qu'à 21°C. Ceci laisse supposer qu'une température plus élevée peut entraîner une

dégradation plus rapide du produit, tout comme observée avec l'extrait brut (Dumas, 1991). D'autres expériences devront être réalisées afin de vérifier cette hypothèse.

CONCLUSION

Le but principal de cette étude est d'accumuler des données de base sur des extraits d'origine fongique, qui pourront indiquer les possibilités de poursuivre les recherches sur les mouches noires et/ou moustiques. Ceci, en vue d'élaborer un nouveau larvicide pour le contrôle des populations de Simuliidae et/ou de Culicidae. C'est à partir d'un milieu de culture que le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, reconnu pour sa pathogénicité sur plus de 8 ordres d'insectes (Veen, 1968; Samuels *et al.*, 1989), produit les 14 destruxines identifiées jusqu'à ce jour (Païs *et al.*, 1981). L'utilisation de la destruxine E dans plusieurs bioessais a comme objectif de faciliter la compréhension du mode d'action des extraits, puisqu'elle est la constituante la plus abondante (22%) parmi les destruxines et que des travaux antérieurs démontrent sa grande toxicité sur ces diptères par rapport à deux autres destruxines (Destruxines A et B) (Fargues et Robert, 1986; Lepage *et al.*, 1991).

Les résultats obtenus comportent plusieurs éléments importants, tant au niveau des nouvelles connaissances acquises par rapport aux extraits et à la destruxine E, mais également sur l'orientation des études ultérieures. Ces résultats nous montrent

aussi la complexité que comporte l'étude de tels composés. Ceci peut s'expliquer par la présence des diverses substances retrouvées dans les extraits et dont les effets de chacune d'elle demeurent encore mal connus chez les insectes ou chez d'autres organismes vivants.

Bien que certains traitements réalisés sur des larves de simulies présentent un aspect positif quant au potentiel des extraits comme nouveau pesticide, il reste que les possibilités de les utiliser comme insecticide, dans un avenir rapproché, sont plus plausibles au niveau du contrôle des populations de moustiques.

Les tests qui seront réalisés chez les simulies devront s'orienter par rapport à deux éléments qui ont sûrement joué un rôle important dans la réussite ou l'échec de nos traitements. Ces éléments sont le temps de contact et la composition de la solution mère.

Le rôle de ce premier élément pourrait être déterminant quant à la possibilité d'utiliser les extraits pour le contrôle des simulies. Les données recueillies démontrent que l'application d'extrait (Lot: JD 261) est possible pour un temps de contact d'une heure. Cependant, un temps de traitement plus court pourrait être envisagé dans les futurs bioessais. Les résultats qui pourraient découler de tels traitements laissent entrevoir deux éventualités. Celles-ci sont basées sur les hypothèses qui sont élaborées suite à

l'analyse des données récoltées lors de nos traitements sur le terrain.

La première éventualité est en rapport avec la quantité de particules présentes dans le milieu. Si le temps de traitement serait diminué, il est évident que la quantité totale d'insecticide sera déversée plus rapidement dans le filet d'eau s'écoulant dans la dalle. La quantité de particules présentes alors dans la solution mère sera plus concentrée dans ce filet d'eau. Cette quantité importante de particules pourrait provoquer le même phénomène observé avec la plus forte concentration lors de notre traitement avec le lot JD 261, ce qui a entraîné un plafonnement de la mortalité. Ainsi, pour deux concentrations différentes, le pourcentage de mortalité était le même soit environ 70%.

La seconde éventualité est basée sur la composition de la solution mère. Si effectivement les particules présentes dans la solution sont responsables de la toxicité de l'extrait JD 261 par rapport aux autres lots et que seulement l'ingestion de quelques particules sont nécessaires pour provoquer la mort de la larve, cette quantité plus importante de matières en suspension sera capturée par un plus grand nombre de larves. Le pourcentage de mortalité attendu sera plus élevé. Ainsi, pour une même concentration, la diminution du temps de traitement pourrait entraîner une mortalité plus importante, ce qui est un point intéressant pour un insecticide.

Concernant maintenant le deuxième élément à considérer dans les prochains traitements sur le terrain ou en laboratoire, mentionnons que des travaux récents réalisés avec le lot JD 264 viennent appuyer l'importance de la composition de la solution mère lors d'un traitement. Il semblerait que ce ne soit qu'une question de formulation car, il faut se rappeler que le procédé d'extraction des lots JD 261 et JD 264 n'était pas similaire, ce qui a probablement influencé la composition générale des deux solutions de traitement. Il faut également se souvenir que l'efficacité des deux lots était semblable chez les larves de moustiques. Ainsi, suite à l'incorporation de l'extrait JD 264 dans des particules d'amidon, une concentration létale 50 de 100 ppm a pu être déterminée en laboratoire, après un temps de contact d'une heure chez des larves de simuliés (Masson, 1991).

Il est très difficile pour le moment de déterminer clairement pourquoi un lot est plus efficace qu'un autre. Bien que la composition des extraits semble être important, les recherches effectuées jusqu'à maintenant ne permettent pas de connaître la ou les structures qui synthétise (nt) les substances toxiques dans le champignon et de savoir où ces dernières se retrouvent dans les extraits.

L'effet de synergisme avec le Teknar HP-D[®] et l'extrait brut (JD 261) n'est pas mis en évidence dans ce travail. Cependant, d'autres bioessais devraient se poursuivre dans le même sens, puisque les tests réalisés ici ne sont que des préliminaires, et

que certains facteurs environnementaux ont pu influencer les résultats.

Le bioessai réalisé avec les trois extraits bruts sur des larves néonates génère des résultats hétérogènes. Cependant, il serait intéressant d'entreprendre un autre bioessai mais en utilisant les destruxines pures. Bien que pour l'instant ce genre de bioessai n'est pas très approprié comparativement au test sur 3^{ième} stade où différents types de données peuvent être accumulés comme le retard de croissance et d'émergence, il ne doit pas être écarté définitivement. En effet, il a été démontré pour d'autres insecticides microbiologiques qu'il peut apparaître lors des bioessais des variations importantes entre les réplicats traités avec la même concentration, pouvant expliquer l'hétérogénéité des résultats obtenus (Ridout et Fenlon, 1991). D'autres traitements mathématiques et d'autres bioessais devraient apporter des informations supplémentaires intéressantes.

Malgré un temps de réaction plus long que chez les simulies, les résultats obtenus chez les larves (3^{ième} stade) de moustiques *Aedes triseriatus* avec les extraits ou la destruxine E s'avèrent fructueux. Vivant en milieu stagnant, cela permet l'utilisation de quantité moins importante d'extrait, tout en ayant un temps de contact permanent avec le produit. Bien qu'encore difficiles à expliquer, les réactions des larves de moustiques exposées aux produits sont différentes par rapport aux simulies. Cependant, les résultats démontrent d'une façon évidente l'effet néfaste des

extraits ou de la destruxine E, tout au long du développement des larves qui ont réussi à survivre. La persistance pendant un certain laps de temps tant pour l'extrait que pour la destruxine E, constitue un autre avantage pour un insecticide destiné à la lutte contre les moustiques (Dumas, 1991). Il reste maintenant à vérifier s'il en sera de même en milieu naturel, et également si d'autres espèces de moustiques réagiront de la même façon qu'*Aedes triseriatus*.

Des études histologiques et physiologiques sur des larves de simuliés et de moustiques devraient être faites, afin de déterminer chez ces insectes quand l'effet du toxique entre en action. Il serait plus facile par la suite d'expliquer pourquoi lors de nos traitements sur le terrain, des mortalités chez les larves de simuliés sont observées seulement 1 heure après le traitement alors que chez *Aedes triseriatus*, un minimum de 3 jours est requis pour constater l'efficacité des produits.

Une autre étape à franchir sera d'évaluer l'effet toxique sur la faune non cible reliée aux habitats aquatiques de ces deux diptères. On devra s'attendre à ce que les études réalisées dans l'habitat de la similie soient plus ardues puisque celles-ci vivent dans un écosystème beaucoup plus complexe que les moustiques.

Finalement, la dernière étape et non la moindre sera l'évaluation du potentiel toxique de ces substances d'origine fongique chez les vertébrés. Bien que certaines études

préliminaires laissent entrevoir peu ou pas d'effets toxiques à court terme, il n'en reste pas moins que les risques d'une toxicité chronique devront être étudiés avec beaucoup d'attention (Austwick, 1980; Somerville, 1980; Fargues et Robert, 1986).

BIBLIOGRAPHIE

- AUSTWICK, P.K.C. 1980. The pathogenic aspects of the use of fungi: the need for risk analysis and registration of fungi. *Ecol. Bull.* 31: 91-102.
- BACK, C. et HARPER, P.P. 1979. Succession saisonnière, émergence, voltinisme et répartition de mouches des Laurentides (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 57: 627-639.
- BELLONCIK, S., POULIN, L., MAIRE, A., AUBIN, A., FAUVEL, M. et JOUSSET, F.X. 1982. Activity of California encephalitis group viruses in Entrelacs (province of Quebec, Canada). *Can. J. Microbiol.* 28: 572-579.
- BELLONCIK, S., AUBIN, A., MAIRE, A., BOISVERT, J., GAGNON, R., TH'NG, C., TRUDEL, C. et ARTSOB, H. 1983. Arbovirus studies in the Trois-Rivières area, province of Québec, Canada. *Mosq. News.* 43: 426-431.
- BROWN, A.W.A. et PAL, R. 1973. Résistance des arthropodes aux insecticides. Organisation mondiale de la Santé. Deuxième édition. Série de monographies no.38. Genève. 541 pages.
- CIBOROWSKI, J. J. H. et CRAIG, D.A. 1989. Factors influencing dispersion of larval black flies (Diptera: Simuliidae): effects of current velocity and food concentration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1329-1341.

- COLBO, M.H. et PORTER, G. N. 1980 . The interaction of rearing temperature and food supply on the life history of two species of Simuliidae (Diptera). Can. J. Zool. Vol. 59: 158-163.
- DODGE, H.R. 1966. Studies on mosquito larvae II. The first stage larvae of North American Culicidae and of world Anophelinae. Can. Entomol. 98: 337-393.
- DUMAS, A. 1991. Etude sur la persistance de la destruxine, tester sur des larves de moustiques (*Aedes triseriatus*) dans le milieu environnemental et en laboratoire. Rapport de stage dans le cadre du Baccalauréat en Biologie Médicale. Université du Québec à Trois-Rivières. 37 pages.
- DUNKLE, R.L. et SHASHA, B.S. 1988. Starch - encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17: 120-126.
- FARGUES, J. et ROBERT, P.H. 1986. Potentialités insecticides des destruxines, mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. IVe Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical. Marseille: 357-362.
- FARGUES, J., ROBERT, P.H., VEY, A. et PAIS, M. 1986 . Toxicité relative de la destruxine E pour le lépidoptère *Galleria mellonella* L. Pathologie animale. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 303, Série III: 83-86.

- FERRON, P. 1975. Les champignons entomopathogènes: évolution des recherches au cours des dix dernières années. Bull. SROP/WPRS. 54 pages.
- FINNEY, D.J. 1971. Probit Analysis. Third edition, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, 333 pages.
- FLINT, M.L. et VAN DEN BOSCH, R. 1983. Introduction to integrated pest management. Plenum press. New York. 240 pages.
- GAGNON, D. 1989. Etude de l'effet de l'enrobage de toxines sur des larves de moustiques (*Aedes triseriatus*). Rapport de Stage dans le cadre du Baccalauréat en Biologie Médicale. Université du Québec à Trois-Rivières. 118 pages.
- GUILLET, P. et ESCAFFRE, H. 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s. l. III. Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. W.H.O. document VBC/79. 735. 7 pages.
- HART, D.D. et LATTA, S.C. 1986. Determinants of ingestion rates in filter-feeding larval blackflies (Diptera: Simuliidae). Freshwater biology, 16: 1-14.
- IBARRA, J.E. et FEDERICI, B.A. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 3: 187-192.
- IGNOFFO, C.M. 1988. CRC handbook of natural pesticides. Volume V. Microbial insecticides. Part A. Entomogenous protozoa and fungi. Editeur Ignoffo, C.M. CRC Press, Inc., Florida. 272 pages.

- KABORE, A. 1990. Mise au point d'un mini-système à des fins de bioessais. Rapport de Stage dans le cadre du Baccalauréat en Biologie Médicale. Université du Québec à Trois-Rivières. 98 pages.
- KODAIRA, Y. 1961. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms , *Bombyx mori*. J. Fac.Text. Sci. Technol., Shinshu Univ., no.29, Ser. E: 1-68.
- LACOURSIERE, J.O. 1984. Etude des principaux facteurs influencant la pathogénécité de *Bacillus thuringiensis* sérovariété *israelensis* envers les larves de mouche noires (Dipteres: Simuliidae) . Mémoire de Maîtrise en Sciences de l'Environnement. Université du Québec à Trois-Rivières. 191 pages.
- LACOURSIERE, J.O. et BOISVERT, J.L. 1987 . Short-term maintenance system for Black Fly larvae (Diptera: Simuliidae). J.Med. Entomol.24: 463-466.
- LAIRD, M., AUBIN, A., BELTON, P., CHANCE, M.M., FREDEEN, F.J.H., HAUFE, W.O., HYNES, H.B.N., LEWIS, D.J., LINDSAY, I.S., McLEAN, D.M., SURGEONER, G.A., WOOD, D.M. et SUTTON, M.D. 1983. Insectes piqueurs du Canada: effets sur la santé et conséquences économiques. Conseil National de Recherche du Canada. Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement. Publication C.N.R.C. 19249. Ottawa. 168 pages.
- LEPAGE, S., CHARPENTIER, G., PECQUEUR, D., VEY, A. et QUIOT, J-M. 1991 (Sous presse). Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dans la lutte contre

- les diptères piqueurs. Actes de la Troisième Conférence Internationale des Entomologistes d'Expression Française. Gembloux. Belgique. Mémoires de la Société Royale Belge d'Entomologie. 7 pages.
- MAIRE, A. et AUBIN, A. 1980. Les moustiques du Québec (Diptera: Culicidae). Essai de synthèse écologique. Mémoires de la Société Entomologique du Québec. no.6., 107 pages.
- MASSON, S. 1991. Etude de l'efficacité de l'enrobage de destruxines pour le traitement des larves de mouches noires. Rapport de séminaire dans le cadre du Baccalauréat en Biophysique. Université du Québec à Trois-Rivières. 38 pages.
- MATHER, K. 1965. Analyse statistique en biologie. Gauthier-Villars, Paris, 327 pages.
- McGAUGHEY, W.H., et BEEMAN, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J.Econ. Entomol. 81: 28-33.
- MERRITT, R.W. 1987. Do different instars of *Aedes triseriatus* feed on particles of the same size? J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 94-96.
- MERRITT, R.W. et CRAIG, D.A. 1987. Larval mosquito (Diptera: Culicidae) feeding mechanisms: mucosubstance production for capture of fine particles. J. Med. Entomol. 24: 275-278.
- MIYAKE, T., MAC, N., SHIBA, T., KONDO, S., TAKAHISA, M. et VEDA, R. 1987. Transfection of *Drosophila melanogaster* transposable elements into the *Drosophila hydei* cell line.

- Dans "Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture". Editeur Maramorosch, K. Academic Press, Inc., New-York, Chapitre 16: 251-263.
- MOLLOY, D., GAUGLER, R. et JAMNBACK, H. 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. Journal of Economic Entomology, 74: 61-64.
- MORIN, A., BACK, C., CHALIFOUR, A., BOISVERT, J. et PETERS, R.H. 1988. Empirical models predicting ingestion rates of black fly larvae. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45: 1711-1719.
- MUNSTERMANN, L. E. et WASMUTH, L. M. 1985. *Aedes triseriatus*. Handbook of insect rearing, vol.2, Pritam Singh and R.F. Moore, Amsterdam: 15-24.
- PAIS, M., DAS, B. C. et FERRON, P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. Phytochemistry, 20: 715-723.
- PAPIEROK, B. et BREY, P.T. 1989. A discussion of entomopathogenic fungi and their potential use for the control of insect vectors. Rapport interne de l'Unité de Lutte Biologique contre les Insectes. Institut Pasteur. Paris, France. 14 pages.
- PERTERSON, D. G. et WOLFE, L.S. 1958. The biology and control of black flies (Diptera: Simuliidae) in Canada. Proc. X Int. Congr. Entomol. (Montréal) 3: 551-564.
- PURI, I.M. 1925. On the life-history and structure of the early stages of Simuliidae (Diptera, Nematocera). Part I. Parasitology, 17(3): 295-334.

- RASHED, S.S. et MULLA, M.S. 1989. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 26: 210-216.
- RAVALLEC, M., RIBA, G. et VEY, A. 1989. Sensibilité d'*Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga. 34: 209-217.
- RIDOUT, M.S. et FENLON, J.S. 1991. Analysing dose-mortality data when doses are subject to error. Ann. Appl. Biol. 119: 191-201.
- ROBERTS, D.W. 1973. Means for insect regulation: Fungi. Ann. N.Y., Acad. Sci. 217: 76-83.
- ROBERTS, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. Dans "Microbial control of pests and plant diseases" 1970-1980. Editeur Burges, H.D., Academic Press, New-York.: 441-464.
- ROBERT, P.-H. et FARGUES, J. 1986. Toxicité par ingestion des destruxines A, B et E pour les larves de *Musca domestica* L. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 303, Série III, 15: 641-643.
- ROBERT, P., RIBA, G. FARGUES, J. et VINCENT, J.J. 1986. Comparative susceptibility of mosquitoes larvae to purified destruxines of *Metarhizium anisopliae*. Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Editeur Samson, R.A., Vlak, J.M. et Peters, D. Publie par The Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology. Wageningen, Hollande: 258.
- SAMUELS, K. D. Z., HEALE, J. B. et LLEWELLYN, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of

- Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53: 25-31.
- SAVIGNAC, R. et MAIRE, A. 1981. A simple character for recognizing second and third instar larvae of five canadian mosquito genera (Diptera: Culicidae). Can. Ent. 113: 13-20.
- SCHERRER, B. 1984. Biostatistique. Gaétan Morin éditeur, Québec, Canada, 850 pages.
- SMITH, M.E. 1969. The *Aedes* mosquitoes of New England (Diptera: Culicidae). II. Larvae: Keys to instars, and to species exclusive of first instar. Can. Entomol. 101: 41-51.
- SOMERVILLE, H.J. 1973. Microbial toxins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 217: 93-108.
- TABASHNIK, B.E., CUSHING, N.L., FINSON, N., et JOHNSON, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.
- TABASHNIK, B.E., FINSON, N. et JOHNSON, M. W. 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* : lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 84(1): 49-55.
- TOUSIGNANT, M.E., BOISVERT, J.L. et CHALIFOUR, A. Reduction of mortality rates of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* aqueous suspensions due to freezing and thawing. J. Am. Mosq. Control. Assoc. Accepté pour publication.
- TROUBAT, J.J. 1981. Dispositif à gouttières multiples destiné à tester *in situ* la toxicité des insecticides vis-à-vis des invertébrés benthiques. Rev. Hydrobiol. Trop. 14: 149-152.

- VEEN, K.H. 1968. Recherches sur la maladie due à *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pelerin . Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen. 68:1-77.
- VEY, A., QUIOT, J. M. et PAIS, M. 1986. Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques: étude sur l'infection à *Metarrhizium anisopliae* (Hyphomycète, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères. Pathologie comparée. C. R. Soc. Biol. 180: 105-112.
- VEY, A., QUIOT, J. M. et VAGO, C. 1987. Mode d'action insecticide d'une mycotoxine, la destruxine E, sur les diptères vecteurs et disseminateurs de germes . Pathologie animale. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 304, Série III: 229-234.
- VEY, A. et QUIOT, J.M. 1989. Effet cytotoxique *in vitro* et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarrhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 35: 1000-1008.
- WALLACE, J.B. et MERRITT, R.W. 1980. Filter-feeding ecology of aquatic insects. Ann. Rev. Entomol. 25 : 103-132.
- WOOD, D.M. 1984. Clés des genres et des espèces de moustiques du Canada. Diptera : Culicidae. Ministère de l'agriculture du Canada, Ottawa. Ontario, 92 pages.
- WOOD, D.M. 1985. Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l'homme et au bétail. Agriculture Canada. Publication 1781/F. 38 pages.
- WRIGHT, V.F., VESONDER, R.F. et CIEGLER, A. 1982. Microbial and viral pesticides. Chapitre 17. Mycotoxins and other fungal

metabolites as insecticides. Editeur Kurstak, E. Marcel
Dekker Inc. New-York: 559-583.

ANNEXE I

Préparation de la poudre d'extrait et d'amidon

Les produits ou matériels utilisés dans la fabrication de la pâte d'amidon sont :

- la poudre d'amidon "Ultra sperse"
no. 78.0175 de la compagnie Nacan
Limitée de Montréal
- plaque de plexiglass
- mortier et pilon (Canlab)
- broyeur (broyeur à café (Moulinex))

Etape 1: 21 mg d'extrait brut sont bien dissouts dans 0.3 mL d'acétone. On ajoute 7 mL d'eau d.n.d. et on homogénéise le tout.

Etape 2: On incorpore à la préparation précédente 500 mg de poudre d'amidon "Ultra sperse" et on mélange bien. On étend la pâte sur la plaque de plexiglass préalablement lavée avec de l'alcool 95%.

Etape 3: Après avoir bien séché (environ 6 heures), la pâte est broyée dans le moulinex puis avec le mortier et le pilon pour obtenir de très fines particules.

Au départ, la quantité total de la préparation était de 521 mg mais avec les pertes après les manipulations, la quantité exacte était de 485 mg de poudre.

Ainsi, dans 21 mg d'extrait brut on a 521 mg de poudre alors dans 485 mg de poudre on aura 19.55 mg d'extrait brut.

ANNEXE II

Localisation des sites à simuler

Région de Saint-Mathieu

Direction des levées et de la Cartographie, Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources. Carte 1:50 000. Ottawa: Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources, 31-I/10: Shawinigan. 6^e éd. 1983.

- Lac des Souris: Longitude: 72°58'00" Latitude: 46°35'00"
- Lac Garand: Longitude: 72°57'25" Latitude: 46°30'30"

Région de Saint-Alexis

Direction des levées et de la Cartographie, Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources. Carte 1:50 000. Ottawa: Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources, 31-I/6: Saint-Gabriel-de-Brandon. 3^e éd. 1984.

- Lac Bélanger: Longitude: 73°11'10" Latitude: 46°26'40"

Réserve faunique du Saint-Maurice

Direction des levées et de la Cartographie, Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources. Carte 1:50 000. Ottawa: Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources, 31-I/14: Lac Eveline. 2^e éd. 1977.

- Lac Inman Est: Longitude: 73°08'35" Latitude: 46°58'35"
- Lac du Petit Fraser: Longitude: 73°03'00" Latitude: 46°55'35"

N.B. Il est important de noter que les coordonnées associées à chaque lac ne correspondent pas au lac lui-même mais à l'endroit (décharge) où le prélèvement des larves a été effectué.

ANNEXE III

Systèmes de traitement

Les lettres retrouvées dans les sections qui suivent correspondent aux lettres associées à la légende de chaque figure.

1. Système de traitement en béchers (fig. 3)

- A: Appareil Haake F3-C (Fisher) contenant un antigel (polyéthylèneglycol) pour le circuit fermé.
- B: Tygon de diamètre intérieur 9,5 mm (Fisher).
- F: Disque filtrant pour seringue avec filtre 1,2 μ (Canlab).
- G: Sortie pour l'air comprimé.
- H: Valve métallique rotative pour aquarium (Universal Ltd., Japon).
- I: Tygon de diamètre intérieur 3,2 mm (Fisher).
- J: Verre de montre perforé (Fisher).
- K: Adaptateur Vacutainer B-D 5731 (Fisher).
- L: Tube à usage chirurgical de diamètre intérieur 0,86 mm Intramedic polyéthylène (Fisher).
- N: Bécher en pyrex de 600 mL (Fisher).

2. Système de traitement en tubes (fig. 4)

Les matériaux correspondant aux lettres D, E, F, J et K de la légende (fig. 4) ont déjà été décrits dans le paragraphe précédent (Système de traitement en béciers; F, H, B et I, K, L).

G et H: Tube à essais d'usage général en pyrex (Fisher).

L: Fil métallique flexible recouvert de plastique (Fil électrique à communication multi-paire).

M: Tube de raccord en Y, en nalgène de diamètre extérieur 3,2 mm (Canlab).

N: Tube de jonction en polypropylène pour tube de diamètre intérieur de 4,8 et 9,5 mm (Canlab) et collier en métal (Canadian Tire Inc.).

Le système est installé dans une chambre environnementale Conviren, model 123L; Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Canada.

3. Système de traitement en dalles (fig. 5)

A: Tuyau en polypropylène de diamètre 5 cm (Canadian Tire Inc.).

B: Couvercle avec cadre de bois et moustiquaire

C: Bac en polypropylène d'une capacité de 66,15 litres (Canadian Tire Inc.).

D: Vis en Y (Canadian Tire Inc.)

E: Tuyau à drain en polypropylène de diamètre 3,5 cm.

G: Bouteille de plastique 1,5 litres pour eau de source, munie d'un bouchon de caoutchouc à deux orifices (no.5 et 1/2, Canlab). Deux seringues à tuberculine Plastipak 1 cc (Fisher) sont coupées et insérées dans ces orifices. A l'une d'elle, se rattache un embout (500-1000 μ L) à bout coupé et un tygon (Diamètre intérieur: 3,2 mm) pour permettre l'écoulement du liquide. A l'autre seringue, un tygon (Diamètre intérieur: 6,4 mm) d'une longueur de 8 cm était insere dans celle-ci pour permettre l'entrée d'air sans la perte de liquide. Pour cela, il fallait maintenir le tube vers le haut à l'aide d'un élastique lorsque la bouteille était en position renversée.

H: Gouttière blanche en vinyle et bout (Canadian Tire Inc.)

K: Confection maison composée d'un support de plastique (hauteur de 7 cm et de diamètre de 13 cm) à lequel est collé (Scellant à la silicone) un filet (Maille: 250 μ) fermé en forme de cône.

ANNEXE IV

A) Résultats des expériences avec des larves de simulies

Expérience #1

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 06/06/1989
- Lot: JD 263
- Temps de contact: 24 h
- Température de traitement: 16,5° C
- Volume: 250 mL d'eau d.n.d./bêcher
- 30 larves/bêcher en double
- Provenance des larves: Lac Garand
(07/05/1989)

Tableau 9

Résultats obtenus après 24 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h
Témoin	3 m/60 (0 m/60)*
Témoin acétone	10 m/62 (0 m/62)
40 ppm	32 m/58 (27 m/58)
80 ppm	44 m/61 (41 m/61)
100 ppm	48 m/62 (45 m/62)

* Lorsque la mortalité dans le(s) témoin(s) est supérieur à 5%, les valeurs sont alors corrigées selon la formule d'Abbott (Finney,

1971) et placées entre parenthèses. Par la suite, les traitements statistiques sont réalisées avec les données corrigées.

Expérience #2

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 15/08/1989
- Lot: JD 263
- Temps de contact: 24 h
- Température de traitement: 16,5° C
- Volume: 250 mL d'eau d.n.d./bêcher
- 50 larves/bêcher en simple, en double ou triple
- Provenance des larves: Lac Inman Est
(11/08/1989)

Tableau 10

Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h
Témoin	1 m/101	29 m/101
Témoin acétone	1 m/ 91	24 m/ 91
30 ppm	2 m/ 50	26 m/ 50
70 ppm	11 m/ 48	26 m/ 48
150 ppm	58 m/ 99	87 m/ 99
230 ppm	65 m/100	94 m/100
300 ppm	74 m/101	93 m/101

Expérience #3

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 02/06/1989
- Lot: JD 263
- Temps de contact: 24 h
- Température de traitement: 16,5° C
- Volume: 250 mL d'eau d.n.d./bêcher
- 30 larves/bêcher en double
- Provenance des larves: Lac des Souris
(30/05/1989)

Tableau 11

Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h
Témoin	0 m/56	6 m/53 (0 m/53)
Témoin acétone	1 m/50	6 m/50 (0 m/50)
10 ppm	1 m/55	10 m/52 (4 m/52)
20 ppm	1 m/59	13 m/56 (7 m/56)
40 ppm	3 m/52	18 m/48 (14 m/48)
80 ppm	14 m/58	20 m/45 (16 m/45)

Expérience #4

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 13/06/1989
- Lot: JD 263
- Temps de contact: 24 h
- Température de traitement: 16,5° C
- Volume: 250 mL d'eau d.n.d./bêcher
- 30 larves/bêcher en double
- Provenance des larves: Lac Garand
(07/06/1989)

Tableau 12

Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h
Témoin	2 m/56	2 m/56 (0 m/56)
Témoin acétone	2 m/56	4 m/56 (0 m/56)
40 ppm	2 m/58	13 m/58 (9 m/58)
80 ppm	0 m/56	17 m/56 (14 m/56)
100 ppm	2 m/58	22 m/58 (19 m/58)
120 ppm	4 m/56	29 m/56 (27 m/56)

Expérience #5

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 29/03/1990
 - Lot: JD 263
 - Temps de contact: 1 h
 - Acclimatation: de 4° à 13°C graduellement pendant 2 j
 - Température de traitement: 13°C
 - Volume: 40 mL d'eau d.n.d./tube
 - 40 larves/tube en triple
 - Provenance des larves: Lac Bélanger (19/03/1990)
 - Larves nourries avant et après le traitement avec de la nourriture pour poissons rouges Nutra Fin: 7 mg nourriture broyée/10 mL d'eau d.n.d.: 0,35 mL du mélange/tube

Tableau 13

Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h
Témoin	0 m/120	30 m/120
10 ppm	1 m/120	12 m/120
20 ppm	6 m/120	19 m/120
40 ppm	20 m/120	32 m/120
60 ppm	71 m/120	92 m/120
80 ppm	81 m/120	103 m/120
100 ppm	103 m/120	111 m/120

Expérience #6

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 21/03/1990
 - Lot: JD 263
 - Temps de contact: 1 h
 - Acclimatation: de 4° à 13°C graduellement pendant 2 j
 - Température de traitement: 13°C
 - Volume: 40 mL d'eau d.n.d./tube
 - 40 larves/tube en simple ou en double
 - Provenance des larves: Lac Bélanger (19/03/1990)
 - Larves nourries avant et après le traitement avec nourriture pour poissons rouges (Idem à Exp.#5).

Tableau 14

Résultats obtenus après 24 et 48 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h
Témoin	0 m/80	2 m/80
9 ppm	0 m/40	1 m/40
47 ppm	0 m/40	9 m/40
93 ppm	9 m/39	23 m/39
186 ppm	16 m/38	34 m/38

Expérience #7

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 24/04/1990
 - Lot: JD 263
 - Temps de contact: 1 h
 - Acclimatation: de 6° à 9°C graduellement pendant 1 j
 - Température de traitement: 9°C
 - Volume: 40 mL d'eau d.n.d./tube
 - 40 larves/tube en triple
 - Provenance des larves: Lac Bélanger
(17/04/1990)
 - Larves nourries avant et après le traitement avec nourriture pour poissons rouges (Idem à Exp. #5).

Tableau 15

Résultats obtenus après 24, 48, 72 et 96 heures d'observation

Concen- trations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h	Mortalités après 72 h	Mortalités après 96 h
Témoin	4 m/117	13 m/117	18 m/117 (0 m/117)	23 m/116
10 ppm	6 m/115	16 m/112	28 m/110 (13 m/110)	45 m/110
20 ppm	5 m/118	16 m/116	30 m/115 (15 m/115)	51 m/115
40 ppm	7 m/117	16 m/115	34 m/114 (21 m/114)	65 m/114
60 ppm	9 m/115	17 m/113	54 m/112 (44 m/112)	76 m/112
80 ppm	28 m/119	46 m/117	70 m/113 (60 m/113)	96 m/113
100 ppm	60 m/117	75 m/117	89 m/117 (84 m/117)	98 m/117

Expérience #8

- Conditions expérimentales: (Terrain)
- Date de l'expérience: 29/05/1990
 - Lot: JD 261
 - Temps de contact: 1 h
 - Température de traitement: 12° à 16°C
 - Débit des dalles: 0.09 à 0.1 L.s⁻¹
 - Provenance des larves: Lac Petit
Fraser
 - Espèces: 63% *Simulium venustum* /
verecundum
30% *Simulium tuberosum*
6% *Simulium* sp.
1% *Simulium corbis*

Tableau 16

Résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'observation

Concentrations	Mortalités après 24 h	Mortalités après 48 h	Mortalités après 72 h
Témoin	3 m/719	6 m/719	8 m/719
Témoin acétone	2 m/664	9 m/664	10 m/664
0.18 ppm	68 m/624	85 m/632	98 m/639
0.69 ppm	315 m/813	347 m/806	360 m/813
1.28 ppm	474 m/882	497 m/897	511 m/903
2.46 ppm	492 m/701	509 m/707	523 m/723
3.93 ppm	530 m/783	567 m/797	583 m/794

Expérience #9

- Conditions expérimentales:
(Terrain)
- Date de l'expérience: 30/05/1990
 - Lot: JD 263
 - Temps de contact: 1 h
 - Température de traitement: 15°C
 - Débit des dalles: 0.09 L.s⁻¹
 - Provenance des larves: idem à #8
 - Espèces: idem à #8

Expérience #10

- Conditions expérimentales:
(Terrain)
- Date de l'expérience: 06/06/1990
 - Lot: JD 264
 - Temps de contact: 1 h
 - Température de traitement: 12°C
 - Débit des dalles: idem à #8
 - Provenance de larves: Lac Petit
Fraser
 - Espèces: 70% *Simulium venustum* /
verecundum
26% *Simulium tuberosum*
2% *Simulium decorum*
2% *Simulium sp.*

Expérience #11

- Conditions expérimentales:
(terrain)
- Date de l'expérience: 13/06/1990
 - Lot: JD 264 avec les solutions de
CaCl₂ et Na₂HPO₄
 - Temps de contact: 1 h
 - Température de traitement: 17° C
 - Provenance de larves: Lac Inman Est
(12/06/1990)
 - Espèce: 100% *Simulium venustum* /
verecundum
 - Débit de dalle: 0.09 L•s⁻¹

Expérience #12

- Conditions expérimentales:
(terrain)
- Date de l'expérience: 07/06/1990
 - Lot: JD 261 (préparation du 29/05/90)
 - Temps de contact: 1 h
 - Température: 17° C
 - Provenance des larves: Lac Petit
Fraser (05/06/90)
 - Espèces: idem à #10
 - Débit des dalles: 0.09 L•s⁻¹

B) Résultats des expériences avec des larves de moustiques

Expérience #13

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 08/12/1991
- Lots: JD261, JD263 et JD264
- 1 larve / cupule, 32 cupules pour chaque concentration, en triple.
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: néonate

Tableau 17

Résultats obtenus après 24 heures sur des larves néonates
exposées aux extraits bruts

Concentrations	Lot JD261	Lot JD263	Lot JD264
Témoin	6m/96 (0m/96)	6m/96 (0m/96)	7m/96 (0m/96)
Témoin acétone	8m/96 (0m/96)	8m/96 (0m/96)	9m/96 (0m/96)
8 ppm	27m/96 (21m/96)	15m/96 (8m/96)	19m/96 (11m/96)
16 ppm	34m/96 (29m/96)	30m/96 (24m/96)	29m/96 (22m/96)
32 ppm	37m/96 (32m/96)	37m/96 (32m/96)	35m/96 (29m/96)
48 ppm	44m/96 (39m/96)	38m/96 (33m/96)	39m/96 (33m/96)
64 ppm	36m/96 (31m/96)	42m/96 (37m/96)	46m/96 (41m/96)
96 ppm	51m/96 (47m/96)	47m/96 (42m/96)	56m/96 (52m/96)
128 ppm	71m/96 (69m/96)	59m/96 (56m/96)	74m/96 (68m/96)
192 ppm	83m/96 (82m/96)	73m/96 (71m/96)	80m/96 (79m/96)
256 ppm	93m/96 (93m/96)	86m/96 (85m/96)	82m/96 (81m/96)
320 ppm	96m/96 (95m/96)	91m/96 (90m/96)	96m/96 (95m/96)
512 ppm	96m/96	94m/96 (94m/96)	96m/96

Expérience #14

Conditions expérimentales: - Date de l'expérience: 07/12/1989
 - Lot: JD 263
 - 50 larves / 100 mL, en simple, en double
 - Température de traitement: 21°C
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Tableau 18

Résultats obtenus après 6 et 11 jours d'observation

Concentrations	Mortalités après 6 j	Mortalités après 11 j
Témoin	2 m/100	7 m/100 (0 m/100)
Extrait brut 7 ppm	2 m/ 50	3 m/ 50 (0 m/ 50)
Extrait brut 13 ppm	3 m/ 50	6 m/ 50 (3 m/ 50)
Extrait brut 27 ppm	24 m/ 50	27 m/ 50 (26 m/ 50)
Extrait brut 53 ppm	41 m/ 50	49 m/ 50 (49 m/ 50)
Témoin amidon 7 ppm & 53 ppm	0 m/100	1 m/100
Extrait enrobé 7 ppm	3 m/ 50	3 m/ 50
Extrait enrobé 13 ppm	7 m/ 50	14 m/ 50
Extrait enrobé 27 ppm	18 m/ 50	28 m/ 50
Extrait enrobé 53 ppm	30 m/ 50	43 m/ 50

Expérience #15

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 18/04/1990
- Lot: JD 263
- 50 larves / 100 mL, en simple, en double ou triple
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Tableau 19

Résultats obtenus après 7, 11, et 13 jours d'observation

Concen- trations	Mortalités après 7 j	Mortalités après 11 j	Mortalités après 13 j
Témoin	2 m/100	3 m/100	6 m/100 (0 m/100)
Extrait brut 6 ppm	0 m/ 50	1 m/ 50	4 m/ 50 (1 m/ 50)
Extrait brut 8 ppm	3 m/100	16 m/100	27 m/100 (22 m/100)
Extrait brut 15 ppm	49 m/100	81 m/100	87 m/100 (86 m/100)
Extrait brut 25 ppm	84 m/101	95 m/101	97 m/101 (97 m/101)
Extrait brut 45 ppm	98 m/100	100 m/100	100 m/101
Témoin amidon 45 ppm	5 m/101	5 m/101	5 m/101
Extrait enrobé 8 ppm	9 m/150	31 m/150	44 m/150
Extrait enrobé 15 ppm	3 m/100	19 m/100	25 m/100
Extrait enrobé 25 ppm	30 m/100	47 m/100	52 m/100
Extrait enrobé 45 ppm	66 m/100	84 m/100	88 m/100

Expérience #16

Conditions expérimentales: - Date de l'expérience: 13/01/1992
 - Lot: JD 264
 - 45 larves / 100 mL, en double ou en triple
 - Température de traitement: 21°C
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Tableau 20

Résultats obtenus après 3, 7, 11 et 13 jours d'observation
 avec le lot JD 264

Concen- tration	Mortalités après 3 j	Mortalités après 7 j	Mortalités après 11 j	Mortalités après 13 j
Témoin	1m/135	1m/135	1m/135	5m/90
Témoin acétone	1m/135	1m/135	7m/135	6m/90
4 ppm	3m/135	7m/135	21m/135	49m/135
8 ppm	2m/135	6m/135	20m/135	41m/135
15 ppm	5m/135	20m/135	35m/90	39m/90
20 ppm	7m/135	49m/135	64m/90	67m/90
30 ppm	18m/135	85m/135	85m/90	87m/90
35 ppm	29m/135	104m/135	129m/135	135m/135
60 ppm	56m/135	118m/135	134m/135	135m/135

Expérience #17

Conditions expérimentales: - Date de l'expérience: 06/07/1990
- Lot: JD 264
- 45 larves/ 100 mL, en double
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #18

Conditions expérimentales: - Date de l'expérience: 06/11/1989
- Destruxine E
- 75 larves/ 200 mL, en double ou en
triple
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #19

Conditions expérimentales: - Date de l'expérience: 16/11/1989
- Destruxine E
- 50 larves/ 100 mL, en double
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #20

Conditions expérimentales:

- Date de l'expérience: 13/02/1990
- Destruxine E
- 45 larves/ 100 mL, en double ou en triple
- Température de traitement: 21°C
- Stade larvaire: 1^{ier} (24 h après l'éclosion)

Tableau 21

Résultats obtenus après 3, 7 et 14 jours d'observation

Concentrations	Mortalités après 3 j	Mortalités après 7 j	Mortalités après 14 j
Témoin	1 m/128	8 m/128 (0 m/128)	11 m/128 (0 m/128)
Témoin acétone	0 m/ 89	2 m/ 89 (0 m/ 89)	2 m/ 89 (0 m/ 89)
Destruxine E 1 ppm	4 m/129	14 m/129 (7 m/129)	19 m/129 (9 m/129)
Destruxine E 2 ppm	3 m/107	10 m/107 (3 m/107)	15 m/107 (6 m/107)
Destruxine E 4 ppm	11 m/116	51 m/116 (46 m/116)	80 m/116 (77 m/116)
Destruxine E 6 ppm	11 m/141	102 m/141 (99 m/141)	138 m/141 (138 m/141)
Destruxine E 8 ppm	22 m/132	114 m/132 (112 m/132)	131 m/132 (131 m/132)

Expérience #22

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 01/12/1989
 - Lot: Destruxine E (Solution fraîche) et Destruxine E préparé en solution depuis le 16/11/89 et réfrigéré à 4 ° C (Solution vieille de 15 j)
 - Température de traitement: 21°C
 - 45 larves/ 100 mL, en double
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #23

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 04/02/1990
 - Lot: Destruxine E préparé en solution depuis le 16/11/89 et réfrigéré à 4° C. (vieille de 10 sem et 5 j)
 - Température de traitement: 21°C
 - 45 larves/ 100 mL, en simple ou en double
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #24

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 11/03/1990
 - Lot: Réutilisation des pots et du contenu liquide de l'expérience #21 (Solution vieille de 15 sem et 5 j à 4° et 21° C)
 - Température de traitement: 21°C
 - 45 larves/ 100 mL, en simple ou en double
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)

Expérience #25

- Conditions expérimentales:
- Date de l'expérience: 09/04/1990
 - Lot: Réutilisation des pots et du contenu liquide de l'expérience #18 (Solution vieille de 7 sem et 6 j à 21° C)
 - Température de traitement: 21°C
 - 45 larves/ 100 mL, en triple
 - Stade larvaire: 3 ième (6 j)